

Title	水環境化学物質の遺伝毒性評価に関する研究(Dissertation_全文)
Author(s)	小野, 芳朗
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1993-11-24
URL	http://dx.doi.org/10.11501/3073224
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

新 制
工
934
京大附図

水環境化学物質の遺伝毒性評価に関する研究

1993年2月

小 野 芳 朗

水環境化学物質の遺伝毒性評価に関する研究

1993年2月

小 野 芳 朗

目次

	page
第1章 緒論	1
第1節 本研究の背景	1
第2節 水環境試料への変異原性試験の適用例と問題点	2
第3節 本論文の構成	8
第2章 遺伝毒性試験の水環境試料への適用性の検討	12
第1節 概論	12
第2節 <u>umu</u> テストによる遺伝毒性試験の簡便化と定量化	13
2-1 概説	13
2-2 小田らによって開発された <u>umu</u> テストの標準法	13
2-3 増殖速度と前培養時間	15
2-4 化学物質の溶媒の影響	15
2-5 細胞膜破碎液による酵素活性発現効果	16
2-6 化学物質との反応時間	17
2-7 菌体量当りの化学物質質量	19
2-8 まとめ	21
第3節 <u>umu</u> テストにおける遺伝毒性誘発現象の評価	22
3-1 概説	22
3-2 実験方法	22
3-3 塩素処理生成物の遺伝毒性誘発	24
3-4 オゾン処理生成物の遺伝毒性誘発	31
3-5 m-クロフェノールの遺伝毒性誘発	35
3-6 化学物質の挙動と細胞のエネルギー	35
3-7 再増殖菌の変異	40
3-8 まとめ	42
第4節 結語	43
第3章 化学酸化処理生成物の遺伝毒性	46
第1節 概論	46
第2節 <u>umu</u> テストによる遺伝毒性	48
2-1 概説	48
2-2 実験方法	48

2-3	反応時間2時間に対する判定	49
2-4	反応時間を長時間とした場合の判定	54
2-5	まとめ	57
第3節	染色体異常誘発性	58
3-1	概説	58
3-2	染色体異常試験法	59
3-3	化学物質の細胞生存率への影響	60
3-4	染色体異常誘発性の濃度効果	62
3-5	構造異常に関する考察	63
3-6	化学物質の染色体異常誘発性	66
3-7	まとめ	66
第4節	結語	67
第4章	化学物質に対する構造相関とリスク評価の適用	71
第1節	概論	71
第2節	芳香族有機塩素化合物の遺伝毒性と構造相関	72
2-1	概説	72
2-2	実験方法	73
2-3	芳香族有機塩素化合物の遺伝毒性の検出	74
2-4	遺伝毒性と構造因子の相関関係	80
2-5	まとめ	84
第3節	umuテストへの標的論の適用と化学物質のリスク評価	85
3-1	標的論の概説	85
3-2	One-hit modelの適用	86
3-3	遺伝毒性リスク評価の検討	89
3-4	まとめ	92
第4節	結語	92
第5章	水環境へ流入する生活起因有機物質の遺伝毒性評価	95
第1節	概論	95
第2節	都市下水中の遺伝毒性物質のumuテストによる検索	96
2-1	概説	96
2-2	実験方法	96
2-3	各試料の水質値	99
2-4	濃縮法と有機物の吸着効率	100
2-5	遺伝毒性	102

2-6	分画	105
2-7	オゾン処理による遺伝毒性物質の除去	108
2-8	まとめ	109
第3節	し尿中の遺伝毒性の検索と制御	110
3-1	概説	110
3-2	実験方法	110
3-3	し尿中の色素、難分解性成分のオゾン酸化による除去	113
3-4	し尿中の遺伝毒性の検出とそのオゾン処理	122
3-5	まとめ	125
第4節	結語	126
第6章	終論	129

第1章 緒論

第1節 本研究の背景

本研究では水環境中に存在する化学物質が、水道水源に流入しヒトに対して毒性を及ぼす可能性があるという観点から、とくに遺伝毒性影響の試験法の検討と、実際の水環境試料への適用性、及び評価を論じている。

遺伝毒性とは、人間の体を構成する細胞の核内遺伝子や、染色体等の遺伝情報に損傷を与え、それが起因となって突然変異や染色体異常が誘発され、これが発癌の原因となったり、生殖細胞を通して遺伝的障害として発現することを指している。つまり遺伝毒性 (genotoxicity) の概念は、DNA 損傷から修復ミス、突然変異、染色体異常を通じた遺伝子上の障害全般を示す用語として用いられてきているようである。これに対し、変異原性といった場合には、DNA 鎖上の塩基が何らかの原因で変異している現象や、染色体の上に明らかな交換などの異常が認められる場合や、それが原因で細胞の突然変異、異常細胞が生成することをさす。したがって変異原性の用語が使われる場合には、DNA 損傷や修復ミスの現象、あるいは染色体異常性とは厳密に区別されていることが多い。

発癌性がいくつかの遺伝子障害の複合的な促進による細胞の癌化を指す用語であるが、遺伝毒性と密接な関係があることが定見となりつつある¹⁾。細胞の癌化へ至るプロセスには様々の要因があり、多段階発生説が一般には受け入れられている。概念的には三大別されている。第一段階は標的細胞の遺伝子に直接作用して遺伝的变化を起こす一次発癌物質 (primary carcinogen)、または genotoxic carcinogen と呼ばれる。これは生体内で代謝活性化され DNA の求核部位と結合していわゆる DNA 付加体 (DNA adduct) を生成したり、活性酸素を生成して DNA 修飾をおこす。第二段階は生体内の特定部位に遺伝子変化の起こりやすい状態を作る二次発癌物質 (secondary carcinogen)、または epidegenic carcinogen がある。これは特定組織に壊死と再生を繰り返すような物質や、生体内分泌物質を乱す物質などである。第三段階は、プロモーション (promotion) と呼ばれる段階である。これは、イニシエーション (initiation) により突然変異を起こした細胞が、細胞膜や細胞質などの変化を起こして異常増殖能を獲得する過程をいう。このように細胞の癌化は突然変異と密接な関係にあるが、本研究ではとくに initiation 段階の最初に生起するであろう遺伝毒性を取り扱っている。

水環境中の化学物質で発癌性物質の存在が特に問題となってきたのは、1974年ニューオーリンズ市水道水中から発見されたトリハロメタン以来である。トリハロメタンは水道水源中のフミン質などの前駆体に対して消毒のための塩素を注入することにより生成する。その中のクロホルムに発癌性が認められるという報告により、水環境中化学物質に対する遺伝毒性、変異原性などの研究が展開されるようになってきた。

クロホルムの発癌性は、IARC モノグラフ (1979) によれば²⁾、マウスとラットに対する経口投与によって、マウスに肝癌、雄ラットに腎の悪性腫瘍、雌ラットに甲状腺の腫瘍を発生させたと報告している。ただヒトに対する症例、疫学的データは十分に収集されていない。また *Salmonella typhimurium* によるバクテリアの変異原性試験では陰性であった。こ

れによりモグラでは、実際上ヒトに対しても発癌のリスクがあると認めてもよいとしている。

アメリカ合衆国環境保護庁(U.S.EPA)飲料水局(ODW)のHealth Advisory Program(HA)³⁾は、特定汚染物質または化合物の、特定曝露期間に発癌性を示す有害な健康影響を生じないと予測される飲料水中の汚染物質の濃度を評価している。1987年のHAでは49化学物質の評価がなされているが、有機物では多くの有機塩素化合物に加え、塩化ビニルや有機溶剤のクロロフルオロ炭化水素類、除草剤のペンタクロロフェノール、ダイオキシンなど多様な化学物質の評価がなされている。

農薬、除草剤は近年水域汚染とその毒性のため注視されつつある物質群である。農薬の使用はわが国では半分近くが水田で使用されているとされる。その変異原性については、Captan, Captan, NAC, MNEB, Sumition, DDVP, DEP, Dimethoate, MTMC について、いずれも染色体異常試験で陽性が検出され、さらにその代謝体はより強い異常性を示すことが報告されている⁴⁾。

このように飲料水中に混入する可能性のある微量汚染物質や、塩素消毒による有機塩素化合物に対しての対応策として、カビ臭除去も含めて導入が急速にひろがりつつあるのがオゾン酸化である。その酸化副生成物に脂肪族アルデヒド、ケトン類に変異原性を有する物質の存在することが多く報告されているため⁵⁾、オゾン処理の安全性についての議論が絶たない。しかしながら、これは消毒法として塩素処理による有機塩素化合物の有する毒性と定量的な比較を実施して議論すべきで、その残留性ともども評価の対象として考慮すべきであろう。

さらに水環境中への有機物の負荷としては下水処理水の放流を考慮に入れる必要があるが、下水中に含まれるし尿、いわゆるヒトふん便には、かなりの変異原性物質が存在することが予想される。それは発癌が、その多くが我々の日常生活様式、とくに食生活に起因しているといわれ、加熱食品中のヘテロサイクリックアミンや、タバコの喫煙によるものとされる。これらの摂取化学物質が体内を経て、ふん便内に排泄されることは十分に考えられる。事実焼いた牛肉には強力な変異原である2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline(MeIQx)が存在するが、これを摂取した人間のふん便中にはやはりMeIQxが確認されている⁶⁾。またタバコを喫煙する人間の尿中には、S9mix存在下でのo-7セチル転移酵素活性化物(7-OH-Aroclor)が存在し、変異原性を示すことが認められている⁷⁾。このような変異原性物質には、また摂取した食物中の成分を腸内菌叢が嫌氣的に代謝し、変異原として活性化することも知られている。たとえばグルコースや、これを含む赤ワイン、紅茶がふん便の抽出液(fecalase)の添加によりAmes試験で陽性を示したとする⁸⁾。し尿が水域への変異原の負荷として大きくウェイトをしめる可能性のあるならば、処理場におけるこれらの挙動もきわめて重要な関心事となるであろう。

第2節 水環境試料への変異原性試験の適用例と問題点

水環境試料に含まれる変異原性物質を検出する試みが、飲料水中の安全性の確保という観点から研究者たちによって実施されてきた。その方法、対象試料、濃縮法等に関するまとめを表1-1に示す。

表1-1 水環境試料への変異原性試験の適用

文献No	著者	試験法	対象試水	濃縮法	抽出溶媒
9	亀井・丹保ら (1985)	Amesテスト	泥炭池有機着色水の 塩素、オゾン処理水	XAD2 減圧濃縮 逆浸透膜	メタノール アセトニトリル ジクロロメタン
10	奥山・丹保ら (1987)	Rec-assay	泥炭池底泥などの塩素 処理水	減圧濃縮	アルカリ抽出
11	亀井・丹保ら (1989)	Amesテスト	泥炭池着色水、2次処 理水の遊離塩素、クロロ ミン、二酸化塩素処理水	減圧濃縮	ジクロロメタン
12	浦野ら (1988)	Amesテスト	腐葉土抽出水の塩素処 理水	CSP800 CHPA25	DMSO 4N NaNO3
13	富田・浜田ら (1980)	Amesテスト	河川水とその塩素処理 水	減圧濃縮＋ 凍結乾燥	—
14	内海・浜田ら (1990)	Amesテスト	河川水	ブルーコットン	0.5%アノニア+メタ ノール
15	佐谷戸・中室 ら(1992)	Amesテスト	河川水とその塩素・オ ゾン処理水	XAD2	ジクロロメタン メタノール
16	布柴・西岡ら (1983)	DNA修復試 験	水道水(東京、名古屋 、京都、大阪)	XAD2	ジエチルエーテル
17	松井ら (1985)	Rec-assay	都市下水 2次処理水	液液抽出 XAD2 ブルーコットン	ジクロロメタン エーテル メタノール
18	中室・佐谷戸 ら(1992)	Amesテスト YG株	芳香族アミノ酸の塩素化 処理	—	—
19	上野・中室・佐 谷戸ら(1992)	Amesテスト ラット肝DNA損 傷	フミン酸のオゾン処理	グリオキサール、メ チルグリオキサール を試水に同定	—
20	近藤・石黒ら (1992)	Amesテスト YG株	殺虫剤、殺菌剤、除草 剤	—	—
21	染谷・鯉川ら (1992)	Amesテスト	廃棄物埋立地浸出水	液液抽出	ジクロロメタン
22	木苗・山下ら (1990)	海水ナマス	パルプ工場廃水	直接接触	
23	Coleman et. a l. (1984)	Amesテスト	フミン酸の塩素処理	液液抽出	ジクロロメタン ジエチルエーテル
24	Kringstad et .al. (1984)	Amesテスト	パルプ漂白水	モデルにベンゾフ ェノン、ナフタレン、アン トラセン	—
25	Hopke et. al. (1984)	Amesテスト	都市下水処理場汚泥	液液抽出	アセトン ヘキサン
26	Lippincott e t. al. (1990)	Amesテスト	水道水	連続液液抽出	ジクロロメタン
27	Langevin et. al. (1992)	SOSクロモテスト	河川底泥	液液抽出	ジクロロメタン

28	中村・鶴川 (1992)	umuテスト	アミノ酸の塩素処理生成物	—	—
29	山吉ら (1989)	umuテスト	環境水	減圧濃縮 XAD2	ジクロロメタン メタノール
30	Hartemann et. al. (1987)	Amesテスト V79/HGPRT	オゾンを導入した浄水場	XAD4/8	メタノール、アセトン DMSO
31	Kool et. al. (1986)	Amesテスト	浄水場の塩素・オゾン 処理水	XAD4/8	DMSO アセトン
32	Dolara et. al. (1987)	Amesテスト	浄水場の塩素・オゾン 処理水	XAD2	ジクロロメタン クロロホルム
33	Cognet et. al. (1986)	Amesテスト	浄水場の塩素・オゾン 処理水	XAD2/8	ジクロロメタン メタノール
34	Boubigot et. al. (1986)	V79/HGPRT SOSクロモテスト	浄水場の塩素・オゾン 処理水	XAD2/7	メタノール
35	Vartiainen et. al. (1987)	Amesテスト	塩素消毒した飲料水	XAD4/8	ジクロロメタン DMSO
36	Monarca et. al. (1985)	Amesテスト	塩素消毒した飲料水	Sep-pak XAD2	DMSO
37	Fielding et. al. (1987)	Amesテスト	塩素処理生成物 (MX)	XAD2	
38	Holmbom et. al. (1984)	Amesテスト	MX	XAD4/8	
39	Kronberg et. al. (1988)	Amesテスト	MX	XAD4/8	ジエチルエーテル
40	Huck et. al. (1989)	Amesテスト 酵母	塩素・オゾン処理水	XAD2	アセトン/ヘキサン
41	Coleman et. al. (1984)	Amesテスト	フミン質の塩素処理水	液々抽出	ジクロロメタン ジエチルエーテル
42	Holmbom et. al. (1987)	Amesテスト	バルブ漂白水	XAD4	メタノール
43	Ringbard et. al. (1987)	Amesテスト	浄水場の塩素処理水	XAD2/8	メタノール アセトン
44	Meier et. al. (1985)	Amesテスト	フミン質の塩素処理水	液々抽出	ジエチルエーテル エーテル
45	Meier et. al. (1987)	Amesテスト	MX	XAD2/8	アセトン

表中の研究者らは塩素消毒にともなって生成するとされるトリハロメタンを中心とする有機塩素化合物をターゲットとしている。また北ヨーロッパ及びカナダの研究者らはパルプ漂白による有機塩素化合物を扱っている。その中のたとえばクロロホルム等は前述したように発癌性が指摘されている。しかし発癌性試験は時間と労力がかかりすぎるため、発癌性と相関を持つとされるバクテリア系を用いたAmesテストを中心とするバクテリア系の適用が検討されてきている。また対象とされる試水は水道水源水となるような河川水、とくにトリハロメタンなどの前駆体となるフミン質を含む水が対象となり、これに塩素やオゾンによる化学酸化を施したものを試料としている。

濃縮法には、全ての有機物をなるべく回収しようという観点からロータリーエバポレーターによる減圧濃縮法が用いられ、ジクロロメタンによる液液抽出が用いられているが、変異原物質が疎水性画分に多いことからXAD等の樹脂吸着による選択的濃縮が実施される例が多い。また、多環芳香族化合物を選択的に吸着するフルボットン、フルボットン法も適用されつつある。このように、未知の混合試料を対象とする場合には、濃縮の段階で用いる方法により、回収される化学物質のスクリーニングがなされる。したがって対象としている変異原性物質が何か、という点で選択する濃縮法が定まってくる。さらにいえば、化学酸化処理として塩素とオゾンの副生成物を比較していく場合、有機塩素化合物は疎水性のものが多く、これに対してオゾン処理はその酸化力により有機物の親水化を図っていることから、同じ濃縮法で果して目的の変異原性を有する化学物質を回収し得ているか、甚だ疑問のあるところである。

フミン質から生成される有機塩素化合物、あるいはカルボニル化合物が変異原性として報告されつつも、GC/MS等分析技術の発達により含有化学物質の分画、同定が進んでいる。たとえば、Colemanら⁴⁶⁾は、フミン酸の塩素化液中で変異原寄与率の最も高いのは、3-クロロ-4-(ジメチル)-5-ヒドロキシ-2(5H)-フランソ(MX)であり、全変異原性の41%の寄与率を占め、他の塩化フミン酸の9%をはるかに上回っている。Holmbom³⁸⁾、Kronbrg³⁹⁾、Meier⁴⁰⁾ら、特にパルプ漂白水を対象とする研究者もMXの存在を指摘している。もっともこのMXも水環境中では比較的不安定とされ、現場での変異原性の評価となると、未だ定量的見解のないのが実状といえよう。

この観点から、従来水環境試料で着目されてきた変異原としての有機塩素化合物については、表中に示したように、まずその濃縮倍率を増すために樹脂吸着法が用いられること、第2にこれが疎水性であるためXAD吸着で、ジクロロメタンやメタノールによる溶出法が用いられること、さらに現象としてmutationをみるためにAmesテストに適用されていることが特徴としてみられる。このように濃縮法としてXAD樹脂が採用されてきたのは、ひとつは水環境中の変異原物質が有機塩素化合物という疎水性物質であるので、広く用いられるようになってきたが、実際の適用を考えた場合、XADは洗浄操作が煩雑で、水環境試料の変異原試験としての「濃縮-バクテリアアッセイ」試験としてはやや手間がかかりすぎる方法と思われる。また本論文で展開していくが、有機塩素化合物は大きな問題とはいえ、むしろ窒素化合物の存在が大きな遺伝毒性負荷源として存在する可能性があるとき、この「濃縮-アッセイ」系は、その組合せを再考していく必要があると思われる。

濃縮法によるスクリーニングとは別に、菌株によって試料中の化学物質をある程度同定していく方法が開発されつつある。特に変異原性を有するとされる環境中の化

学物質、ニトロアレン、アミノアレンをスクリーニングする目的で国立衛生試験所及び大阪府立公衆衛生研究所の研究グループによる開発が進められつつある。AmesテストではY6株の適用が試みられ、本研究で展開するumuテストにおいても窒素化合物に高感受性を有するNM株が開発されている⁴⁷⁾。

以上のように水環境中に混入する化学物質の遺伝毒性、変異原性についてその評価が展開されつつあるが、特に近年、日本水環境学会では、水環境試料へのハイトアッセイの適用と問題点が議論されつつある。3回に亘るシンポジウムは、最初に「水環境試料への変異原性試験の適用」と題して、水中微量有機物に対する様々なハイトアッセイを用いた変異原性の評価の事例が紹介されている⁴⁸⁾。ここでは水環境試料が混合試料であり、低濃度であることから、濃縮、分画法による評価の差異や、ハイトアッセイの種類による適用の差などが取り上げられた。第二に「水中汚染化学物質のハイトアッセイ系の現状と問題点」として、対象化学物質を有機塩素化合物に絞った場合の各ハイトアッセイ（Amesテスト、Rec-assay、umuテスト、魚類細胞、哺乳動物細胞）の成果が紹介された⁴⁹⁾。これらのシンポジウムの過程で①スクリーニングとしての各アッセイの位置づけ、即ち各細胞での変異誘発の作用機序、②水環境中での蓄積性（生物分解性）、③複合効果、④水環境中での閾値表現、発現確率等の評価法が問題点として浮上した。これらの問題を解くために、「ハクトリアによる安全性評価-人への毒性を中心に」と題し、ハクトリアアッセイの適用性、動物細胞での適用性、遺伝子での適用性と各々化学物質の生体内での作用するメカニズムを解き明かしながら、人間が摂取する可能性のある環境中の水塊を定量的に評価する試みが模索された⁵⁰⁾。そこではたとえば生体内での機構には、たとえばDNA損傷の多くが活性酸素生成に関わる可能性があるとの報告が続き、機構解明に向けた病理学的アプローチが進んでいるものの、それを現場の水環境におとしたとき、どのような評価をすればよいのかが将来の問題点として指摘された。たとえばリスクアセスメントのような確率的評価法と、DNA損傷に関わるメカニズム解明との間を埋めていく知見が必要であるとの認識がなされた。

このように水環境のような混合試料に対応する場合には、適用するハイトアッセイの作用機序を把握しておくこと、何の遺伝毒性を知りたいかにより適用する濃縮法、分画法、ハイトアッセイを選択すること、検出した遺伝毒性の定量的意味付けを評価すること等、複雑な要因を内蔵している分野とみなせる。

表1-2には、細菌細胞を用いた試験、Ames法、Rec-assayさらに本研究で用いるumuテストの比較表を示した。

Ames法は、1971年にカリフォルニア大学のB. Amesらによって開発され普及している *Salmonella typhimurium* TAシリーズを用いる短期アッセイである。菌株は、ヒスチジン合成できないヒスチジン要求性(his⁻)株で、化学物質が遺伝子に作用した場合、ヒスチジンを再び合成できるようになったヒスチジン非要求性(his⁺)の復帰体(revertant)のコロニー数を数えて、その物質の有する突然変異原性を判定する。通常よく使われるのは、塩基対交換型突然変異を検出するTA100(TA1535/pKM101)と、フレームシフト型突然変異を検出するTA98(TA1538/pKM101)である。わが国では1979年改正労働安全衛生法により、労働環境で扱われる全ての新規化学物質は、その名称、物理化学的諸性質等を労働省に届け出るときに、その物質の有害性を微生物変異原性試験で調べた結果を同時に届け出ることが最初の制定となり⁵¹⁾、その後薬事法(1984)、農薬

表1-2 Amesテスト、Rec-assay、umuテストの比較

方法	Rec-assay	umuテスト	Amesテスト
試験菌株	<i>Bacillus subtilis</i> H17 (rec ⁻), M45 (rec ⁺)	<i>Salmonella typhi</i> TA1535/pSK1002	<i>Salmonella typhi</i> . TA98, TA100
SOS反応上の位置	DNA損傷による <u>recA</u> の誘導 ↓ 除去修復の阻害 SOS修復の阻害	DNA損傷による <u>recA</u> の誘導 ↓ LexAリプレッサーの開裂 ↓ SOS遺伝子群の誘発	DNA損傷 ↓ 修復遺伝子群の誘発 ↓ 突然変異

取締法(1985)、化審法(1986)にもとづく試験ガイドラインが公示されている。本法は spot mutation (フレームシフト、塩基対交換)の量を知る試験法であるが、判定に3日かかることや、TA98、TA100株などの現象に特異性のあること、厳密な無菌操作の必要なこと、ヒストジン含有系には適用できないこと、さらに菌の増殖能が重要な指標となるので細胞毒性の強い物質に対しては陰性の結果となること等の短所を有している。

Rec-assayは、DNA損傷性を知る試験法である。枯草菌(*Bacillus subtilis*)のDNA組み換え修復欠損株(rec⁻)と、野生株(rec⁺)を組合せ、化学物質を与えて、DNAに損傷を生じた場合にrec⁻では修復機能が働かず、結果的に増殖してこない生育阻害性を、rec⁺の生育阻害性と比較し、それがDNAの損傷によるものか、他の細胞毒性によるものかを判定する⁵²⁾。しかしながら、本アッセイは細胞増殖阻害曲線を測定して、その野生株との差から判定するため、経時的な変化を正確に追跡する必要があること、無菌操作が必要なこと、また化学物質による細胞毒性の効果がDNA損傷による阻害効果に加わる可能性がある。

umuテストは、加藤ら⁵³⁾によって発見されたrec遺伝子で制御されているSOS遺伝子群の誘発を応用し、小田ら⁵⁴⁾により最終的にAmesの*Salmonella typhi*.の系に誤りがちの修復遺伝子umuDCを入れた検出系である。ここでは化学物質による突然変異誘発の可能性を、修復エラーを3/4の高確率で起こす⁵⁵⁾遺伝子の誘発を直接測定している。小田⁵⁶⁾は、Amesテストにあげた短所を補う形で本試験法を開発した。つまり、判定が数時間で可能なこと、単菌株で判定しうること、ヒストジン含有系に適用可能なこと、抗生物質耐性株で無菌操作が必要でないこと、さらに抗癌剤のように微生物に対して強い細胞毒性を持つ物質にも適用できる点である。umuテストはAmesテストのようなspot mutationは判定し得ないが、少なくともそれに至るミス修復を誘発する遺伝子群を直接測定している。

このような点から、細胞膜透過の容易な *Salmonella* 菌を用いていることも併せ、水環境に適用されている表1-2に示したバクテリアアッセイ中では、umuテストはむしろAmesテストの発展型アッセイと捉えることも可能で、事実前述したようにニコアレーン、アミノアレーンの検出系は、AmesテストではYG株、umuテストではNM株と同じ酵素系導入で、次段階の開発が進み、さらにアルキル化剤検出のada系の開発もAmesテスト、umuテストで同時進行している⁵⁷⁾。

第3節 本論文の構成

本論文では、まず第2章でバクテリアアッセイであるumuテストを水環境中の化学物質に適用していくために、その方法の簡易化と、実際にumuテストによる遺伝毒性の測定条件の明確化を試みた。第3章では化学酸化処理として消毒に適用されている塩素処理とオゾン処理の副生成物の遺伝毒性を評価するために、各々の生成化学物質に関してumuテストと哺乳動物細胞によるin vitroの染色体異常試験を施し、それらの遺伝毒性の大きさに関して定量的考察をおこなった。第4章においては、得られた遺伝毒性の結果の評価手法として、化学物質の有する構造に係わる因子からその誘発するであろう遺伝毒性を推定することを試み、また確率論モデルを適用し、化学物質の実質安全濃度を試算してリスク評価を試みている。さらに第5章では水環境中へ流入する有機物負荷として下水処理場、し尿処理場の処理水に着目し、この中に含まれる有機物の回収及び遺伝毒性の検索を検討し、その除去法としてのオゾン酸化の適用を示唆している。第6章は本論文の成果をまとめ、結論とした。

引用文献

- 1) 高橋通人、林裕造(1989);発癌性、水質汚濁研究、12(10)、621-626
- 2) IARC monographs(1979);Some Halogenated Hydrocarbons, International Agency for Research on Cancer, Vol.20, 401-417
- 3) Office of Drinking Water, U.S.Environmental Protection Agency(1987); Health Advisories, 水質問題研究会訳、日本水道協会
- 4) 石館基(1981);環境変異原物質の現状とその評価、水質汚濁研究、4(3)、127-136
- 5) 永瀬久光(1990);水中有機物のオゾン処理生成物とその変異原性、水質汚濁研究、13(12)、797-800
- 6) Hayatsu, H. et. al. (1985); Fecal mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human, Mutation Research, 143, 207-211
- 7) Einisto, P. et. al. (1990); Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking, Mutation Research, 245, 87-92
- 8) 木内武美他(1990);腸肝循環による変異原物質の活性化・不活性化、環境変異原研究、12、291-303

- 9) 亀井、丹保、田村(1985);塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性、水道協会誌、54(11)、25-33
- 10) 奥山、丹保、亀井(1987);塩素処理により生成する変異原性のRec-assayによる検討、水質汚濁研究、10(4)、251-259
- 11) 亀井、丹保、金子(1989);遊離塩素、クロミン及び二酸化塩素処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性、水道協会誌、58(2)、21-29
- 12) 浦野ら(1988);水道水等の変異原性試験法、水道協会誌、57(3)、36-49
- 13) 富田、真鍋、浜田(1980);河川水及びその塩素処理水の変異原物質について、水質汚濁研究、3(4)、187-192
- 14) 内海、浜田、早津ら(1990);河川水中変異原活性の季節・流域変動、水質汚濁研究、13(4)、227-234
- 15) 佐谷戸、中室、上野(1992);都市河川水とその塩素およびオゾン処理水の変異原性に関する研究、変異原性試験、1(1)、18-27
- 16) 布柴、足達、三枝、西岡(1983);都市水道水の変異原性レベル、同志社大学理工学研究報告、24(3)、61-69
- 17) 松井、小出、高島(1985);枯草菌Rec-assay液体法による都市下水及び活性汚泥処理水中の変異原物質の検出、下水道協会誌、22(250)、50-59
- 18) 入口、橋本、中室、佐谷戸(1992);芳香族アミノ酸の亜硝酸イオン共存下における塩素処理による変異原性の消長に関する研究、第43回全国水道研究発表会講演集、708-710
- 19) 上野、中室、佐谷戸(1992);水のオゾン処理生成物であるグリオキサール誘導体の変異原性及びDNA損傷性、第43回全国水道研究発表会講演集、711-713
- 20) 近藤、石黒ら(1992);農薬の分解性及び変異原性、第43回全国水道研究発表会講演集、723-725
- 21) 染谷、鯉川ら(1992);変異原性試験による廃棄物埋立地処分場浸出水中の微量汚染物質サーベイランス、水環境学会誌、15(4)、244-253
- 22) Kinae, N., Yamashita, M. et al. (1990); A Possible Correlation between Environmental Chemicals and Pigment Cell Neoplasia in Fish, The Science of the Total Environment, 94, 143-153
- 23) Coleman, W. E. et al. (1984); Gas chromatography/mass spectroscopy analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid. A comparison of the byproducts to drinking water contaminants, Environmental Science & Technology, 18, 674-681
- 24) Kringstad, K. P. et al. (1984); Evaluation of lipophilic properties of mutagens present in the spent chlorination liquor from pulp bleaching, Environmental Science & Technology, 18, 200-203
- 25) Hopke, P. K. et al. (1984); Comparison of the mutagenicity of sewage sludges, Environmental Science & Technology, 18, 909-916
- 26) Lippincott, R. L. et al. (1990); Continuous liquid-liquid extraction for the preparation of chlorinated water samples for the Ames bioassay, Water Research, 24(6), 709-716
- 27) Langevin, R. (1992); Genotoxicity in water and sediment extracts from th

- e ST Lawrence River system using the SOS chromotest, Water Research, 26(4), 49-429
- 28) 中村清一、鶴川昌弘(1992);アミノ酸の塩素処理によるSOS反応誘導性物質の生成、水環境学会誌, 15(10)、705-710
- 29) 山吉、土井、奥村、山本(1989);環境水域における変異原活性物質の濃縮法に関する基礎的研究、水道協会雑誌, 58(10)、19-32
- 30) Hartmann, P. et.al. (1987); Cellular Toxicity and Mutagenicity Assays from On-site Sampling of Drinking Water Treatment Plants using Multistage Ozonation, Ozone Sci. Engg., 9, 179-194
- 31) Kool, H. J. et.al. (1986); The Influence of an Ozone, Chlorine and Chlorine Dioxide Treatment on Mutagenic Activity in (Drinking) Water, Ozone Sci. Engg., 8, 217-234
- 32) Dolara, P. et.al. (1987); Effect of Ozonation and Chlorination on the Mutagenic Potential of Drinking Water, Bull. Environ. Contami. Toxicol., 27, 1-6
- 33) Cognet, L. et.al. (1986); Mutagenic Activity of Disinfection By-products, Environmental Health Perspectives, 69, 165-175
- 34) Bourbigot, M. M. et.al. (1986); Role of Ozone and Granular Activated Carbon in the Removal of Mutagenic Compounds, Environ. Health Perspectives, 69, 159-163
- 35) Vartianen, T. et.al. (1987); Comparison of Solvent Extractions and Resin Adsorption for Isolation of Mutagenic Compounds from Chlorinated Drinking Water with High Humus Content, Water Research, 21(7), 773-779
- 36) Monarca, S. et.al. (1985); Microscale Fluctuation Assay coupled with Sep-pak Concentration as a Rapid and Sensitive Method for Screening Mutagens in Drinking Water, Water Research, 19(10), 1209-1216
- 37) Fielding, M. et. al. (1987); The Formation during Drinking Water Treatment, Mutation Research, 118, 25-41
- 38) Holmbom, B. et.al. (1984); Fractionation Isolation and Characterization of Ames Mutagenic Compounds in Kraft Chlorination Effluents, Environmental Sci. Tech., 18, 333-337
- 39) Kronberg, L. et.al. (1988); Identification and Quantification of the Ames Mutagenic Compound 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and its geometric Isomer (E)-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxobutenoic acid in Chlorine-Treated Humic Water and Drinking Extrats, Environmental Sci. Tech., 22(9), 1097-1103
- 40) Huck, P. M. et. al. (1989); pilot scale Evaluation of Ozone and Other Drinking Water Disinfection using Mutagenicity Testing, Ozone Sci. Engg., 11, 245-269
- 41) Coleman, W. E. et.al. (1984); Gas Chromatography/Mass Spectroscopy Analysis of Mutagenic Extracts of Aqueous Chlorinated Humic Acid. A Comparison of the By-products to Drinking Water Contaminants, Environmental Sci. Tec

h., 18(9), 674-681

42) Holmbom, B. et.al. (1984); Fractionation Isolation and Characterization of Ames Mutagenic Compounds in Kraft Chlorination Effluents, Environmental Sci. Tech., 18, 333-337

43) Ringhard, H.P. et.al. (1987); Importance of Sample pH on Recovery of Mutagenicity from Drinking Water by XAD Resins, Environmental Sci. Tech., 21(4), 382-387

44) Meier, J.R. et.al. (1985); Identification of Mutagenic Compounds formed during Chlorination of Humic Acid, Mutation Research, 157, 111-122

45) Meier, J.R. et. al. (1987); Studies on the Potent Bacterial Mutagen, 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone: Aqueous Stability, XAD Recovery and Analytical Determination in Drinking water and in Chlorinated Humic Acid Solutions, Mutation Research, 189, 363-373

46) Coleman, W.E. (1988); GC/MS identification of mutagens in aqueous chlorination humic acid and drinking waters following HPLC fraction of strong acid extracts, Biohazards of Drinking Water Treatment, Lewis Publishers, Inc., Ch. 9, 107-121

47) Oda, Y. et.al. (1992); A sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in Salmonella typhimurium NM1011 having a high nitroductase activity, Mutation Research, 272, 91-99

48) バイオアッセイ研究委員会シンポジウム(1990); 第24回水質汚濁学会講演論文集、日本水質汚濁研究協会、395-416

49) バイオアッセイ研究委員会シンポジウム(1991); 第25回水質汚濁学会講演論文集、日本水質汚濁研究協会、442-453

50) バイオアッセイ研究委員会シンポジウム(1992); 第26回日本水環境学会年会講演論文集、日本水環境学会、494-507

51) 松島泰次郎(1991); 短期検索法の有用性と問題点-微生物変異原性試験-、環境変異原研究、13(3)、279-283

52) 賀田恒夫(1980); 修復テスト; Rec-assay実験法、環境変異原実験法、講談社、48-56

53) Sinoura, Y., Ise, T., Kato, T. and Glickman, B.W. (1983); umuC-Mediated Mismatch Repair Mutagenesis in Escherichia coli; Extent and Specificity of SOS Mutagenesis, Mutation Research, 111, 51-59

54) Oda Y. et. al. (1985); Evaluation of the New System(umu-test) for the Detection of Environmental Mutagens and Carcinogens, Mutation Research, 147, 219-229.

55) Watson, J.D. et. al. (1987); Molecular Biology of the Gene, 4th. ED, The Benjamin/Cummings Publishing Company. Inc., 339-357

56) 小田美光(1992); umu遺伝子の発現を利用した環境変異原物質の短期検索法とその応用に関する研究、大阪府立大学学位論文、49-51

57) 能美、小田ら(1992); 薬物代謝酵素遺伝子の導入とDNA修復遺伝子の破壊による細胞高度感受性テスト株の開発、環境変異原学会第21回大会要旨集、p43

第2章 遺伝毒性試験の水環境試料への適用性の検討

第1節 概論

突然変異の検出法として、種々の体細胞を用いた系が開発されてきている。細菌、酵母などの微生物を用いる突然変異テスト、ムラサキツユクサなどの植物細胞中の染色体異常試験、姉妹染色体交換法による検定、遺伝子突然変異試験法、及び *in vivo* での染色体検査、小核試験、体細胞突然変異検出法などが存在する¹⁾。

このうち、まずスクリーニング法として、Ames法などによる微生物細胞を用いた *in vitro* 試験、*in vitro* での染色体異常試験、そして小核試験が薬事法(1984)変異原試験のガイドライン化もあり、通常よく適用される。微生物細胞を用いた突然変異試験は、化学物質や紫外線によるDNA上のspot mutation(flame shift, base exchange)、あるいは損傷を検索する短期検索法である。DNAの損傷に対する修復機能は、大別して除去修復(excision repair)、組み換え修復(recombinational repair)、2倍体修復、対合誤りの修復(mismatch repair)、そして誘発修復(SOS repair)があるとされる^{1) 2) 3)}。

対合誤りの修復は、自然にある確率で発生する間違いであり、これを除去し、正しい塩基に代える機能のことである。たとえば、DNAの複製において、エラーの頻度は 10^9 塩基対の複製につき1個起こる⁴⁾。除去修復は、損傷塩基をエンドヌクレアーゼで切断した後、無傷の一方のDNA鎖を鋳型としてDNAの合成が進行し、同時に損傷した旧鎖を除去する修復である。組み換え修復は、新鎖の損傷によって生じたDNA上のギャップを、旧鎖から相同な部分をもってきて埋める方法である。この方法には修復エラーはないが、時間がかかる上に、接近して損傷が2つ以上存在すると、この方法では修復できない。そこで、ギャップをでたらめな塩基で埋める方法がある。これを誘導修復、あるいは応急措置を講じDNA合成をおくらせまいとするため、SOS修復と呼ばれる。2倍体修復は、高等生物の体細胞には相同な2本鎖切断が起こっても、1組の無傷な2本鎖DNAの相同部分より修復を行うことである。

SOS誘発は、*recA-lexA*遺伝子に

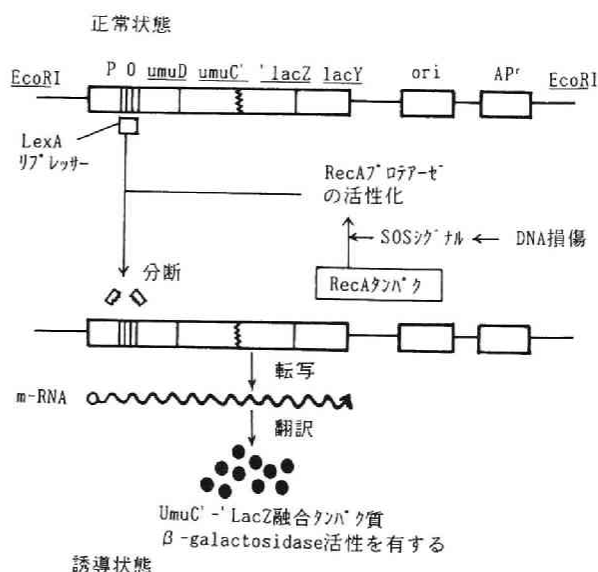


図2-1 SOS反応

よって一連の SOS 遺伝子群を制御された応答系であることが示されている⁵⁾。変異誘発には、アルキル化剤のようなものは *umuDC* 遺伝子非依存性で、特定の種類の塩基置換のみ生ずることより、DNA 合成過程で変異原により修復を受けた塩基位置での対合エラーによるものと考えられている。一方、UV や 4NQO などによる誘発は *umuDC* 依存性であり、個々の変異原によるものと非特異的なものの混じった塩基の置換反応 (DNA のパイルアップ合成に伴うエラーで A 塩基対の誤挿入) で説明できるとされている⁵⁾。

この SOS 反応を遺伝毒性物質の検索に応用したものが、小田らにより開発された *umu* テストである^{6) 7)}。この方法は *umuDC* 遺伝子にラクトースオペロンの一つである *lacZ* 遺伝子を結合させた *umuC'-lacZ* 融合遺伝子をもつプラスミド pSK1002 を作成し、これを化学物質の細胞膜透過性がよい *Salmonella typhimurium* TA1535 株に導入し、遺伝毒性物質により誘発された *umuDC* を *lacZ* の産生する β -galactosidase 活性で測定したものである。この一連の反応モデルを図 2-1 に示す。

本章では *umu* テストを水環境中に存在する化学物質あるいは水環境試料に適用し、その遺伝毒性を評価していく上において、この試験法の迅速かつ簡便な適用法を検討する。そこで小田らの開発した *umu* テスト標準法に対して、まずその測定上の手技、すなわち前培養時間、溶媒、細胞破碎等の諸条件を検討し、測定法の迅速化を図った。また *umuDC* 遺伝子誘発のために要する反応時間が化学物質により異なる、即ち DNA 損傷の機構が異なることによる SOS 誘導性の差異があると考えられる。そこで水環境中に存在すると考えられるモデル物質が、開発者の提示したような標準反応時間より長い時間で *umuDC* 遺伝子を誘発することに着目し、その遺伝子の誘発と、細胞の増殖、細胞エネルギーの挙動を知ることにより、本試験法の水環境化学物質への適用のための測定条件の明確化を試みている。

第 2 節 *umu* テストによる遺伝毒性試験の簡便化と定量化

2-1 概説

本論文を通して遺伝毒性の評価に用いる *umu* テストは、本来発癌性と相関を有するとされる変異原性の迅速試験として開発されてきたものである。本節では、代表的な変異原物質とされる化学物質の遺伝毒性を開発された標準法に対して、試験菌株の前培養時間、溶媒の影響、細胞破碎の効果、化学物質との反応時間、菌体量に対する遺伝毒性の検討をもとに、*umu* テストの簡便化、迅速化による一般化を容易とするための実験条件の明確化を目的とする。

2-2 小田らによって開発された *umu* テストの標準法

図 2-2 に *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 株を用いた小田らによって開発された *umu* テストの試験方法を示した。以下にその方法を概説する。

試験菌株はアンピシリン耐性株で -80℃ で保存され、必要に応じて LB 培地 (バクトトリプトン 10g, NaCl 5g, 酵母エキス 5g, アンピシリン 20mg, 水 1000mL) 中に溶解し 37℃ にて 16 時間培養する (overnight incubation)。これを TGA 培地 (

バクトトリプトン 10 g, NaCl 5g, グルコース 2g, アンピシリン 20 mg, 水 1000mL) で50倍に希釈し、37℃でOD₆₀₀が0.25~0.3となるまで振とう培養する。これに被検化学物質を所定量添加し、37℃で2時間反応させる。ここで代謝活性をみる場合はラット肝ホモジネート画分S9mix (オリエンタル酵母社製、Phenobarbitalと5,6-Benzoflavoneで誘導したもの) を添加する。反応後、菌懸濁液をZ緩衝液 (0.04 M NaH₂PO₄, 0.06 M Na₂HPO₄, 0.001 M MgSO₄, 0.01 M KCl, 0.05 M 2-メルカプトエタノール) で希釈する。細胞膜を破碎して、産生したβ-galactosidaseを抽出するため、トルエンを1滴おとし激しく攪拌した。トルエンを蒸発させた後、酵素の基質2-ニトロフェール-β-D-ガラクトピラノシドを加え、15分間28℃で発色させる。15分後、1M炭酸ナトリウムでpHを上げ酵素反応を停止し、液中のOD₄₂₀, OD₅₅₀を測定する。化学物質と反応して誘発されたumuC'-'lacZ融合遺伝子により生じるβ-galactosidase活性は、Millerの方法⁸⁾により次式で算定する。

$$\beta\text{-galactosidase}(\text{units} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}) = \frac{1000(\text{OD}_{420} - 1.75\text{OD}_{550})}{\text{tvOD}_{600}}$$

ここで OD₄₂₀ ; 420nmでの2-ニトロフェールの吸光度 (細胞片による散乱を含む)
 OD₅₅₀ ; 550nmでの吸光度 (細胞片による散乱)
 OD₆₀₀ ; 600nmでの吸光度 (菌体濃度相当)
 t ; 発色時間 (分)
 v ; 希釈倍率

すなわち算定された酵素活性は、OD₆₀₀を化学物質との反応時における試験株の菌体濃度に相当するものと考えれば、菌体濃度当りの細胞に誘発された修復遺伝子の量を示していることになる。また化学物質によって細胞毒性等により菌体の増殖が停止した場合の評価も上式の分母に示されていることになる。

以下の実験では、小田らが開発した標準法である図2-2中に示した①菌懸濁液の

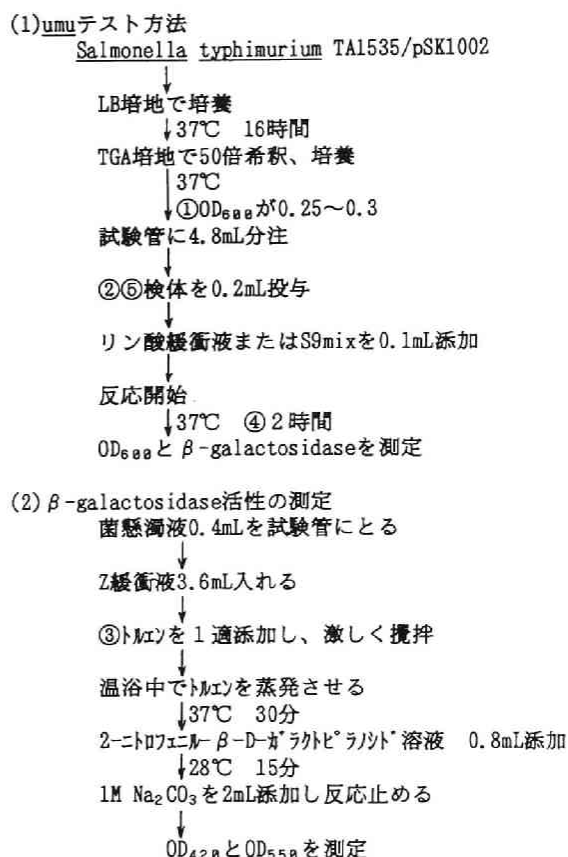


図2-2 umuテスト方法

前培養時間、②化学物質の溶媒の影響、③細胞膜破砕液による酵素活性の発現効果、④化学物質との反応時間、⑤菌体量当りの化学物質量の効果に関して検討を加える。

2-3 増殖速度と前培養時間①

umuテストを開発した小田らによれば、試験株 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002の化学物質との反応に先立つ前培養の時間は、菌懸濁液をTGA培地に投入後、振とう培養して、菌体増殖が対数増殖期にあるとき、すなわち菌懸濁液濃度がOD₆₀₀で0.25から0.3となったときとされている⁹⁾。実際、前培養時にOD₆₀₀をモニターしながら0.25~0.3となる時を決めればよいが、対数増殖期である菌体の増殖は極めて速いため、いちいち取り出して吸光度を測定することは煩雑な操作となる。そこで0.25~0.3となる前培養時間を決めることで前培養時のOD₆₀₀のモニタリングを省くことを検討した。まず先に示した組成のTGA培地で50倍に希釈した菌懸濁液を20mL試験管にいれ、37℃で、120 rpmで振とう培養した。経時的にそのOD₆₀₀吸光度を測定した数回にわたる結果を図2-3中の○に示す。これより平均的なTA1535株の増殖速度は 0.55 hr^{-1} (e底)であった。またこの図より前培養時間はOD₆₀₀が約0.3を示した約3時間程度が必要であることがわかる。

同様な実験を同じ菌株に対して振とう速度を145rpmにして行った結果が、同図中の●である。この場合に求められる平均的な増殖速度は 0.920 hr^{-1} となり、ほぼ2時間でOD₆₀₀は0.25~0.3に達した。このことより、145rpmでは前培養を2時間程度とすればよいことがわかった。このように振とう速度により菌の増殖速度に影響がみられ、120rpmでは3時間、145rpmでは2時間で前培養が終了することが示された。

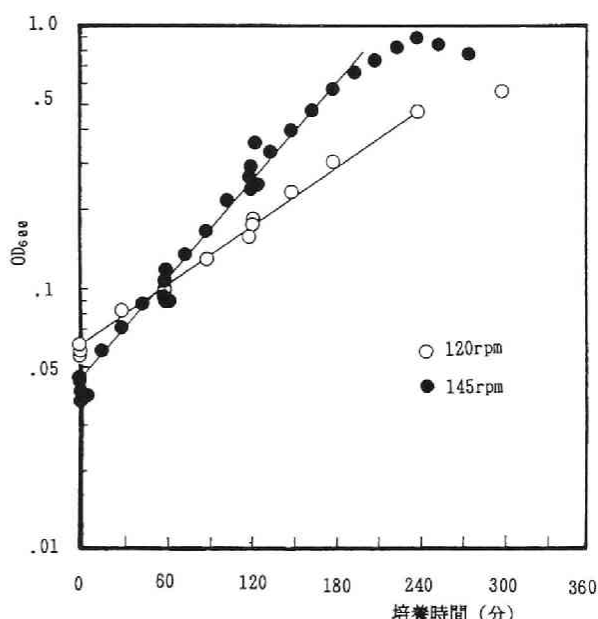


図2-3 試験菌株の増殖

2-4 化学物質の溶媒の影響②

変異原性試験に供する化学物質は水に不溶性もしくは難溶性のものも少なくない。そこで溶媒にエタノールやジメチルスルホキシド (DMSO) をしばしば使用するが、これらの溶媒が変異原性もしくは細胞毒性を示す場合には、試験結果に影響が現れる。

一般に変異原性試験においては対照実験として、陽性対照（必ず変異原活性を示す薬品）と陰性対照として溶媒のみを添加した場合の結果を、検体の試験結果と比較する。しかしながら、もし溶媒対照がかなりの活性を示す場合には、変異原活性の比較的弱い化学物質は、試験で明確に変異原性を測定できない可能性がある。

一般に低濃度では細胞毒性を示さないとされる溶媒としてエタノールやDMSOがあり、培地中における最終濃度を各々1.0%、0.5%以下にすることが望ましいとされる¹⁰⁾。そこで溶媒がumuテストの測定結果に及ぼす影響を調べるために、純水、1% エタノール、0.3% DMSOをそれぞれ図2-1

の試験フローに従って前培養した菌懸濁液と反応させた。すなわち菌懸濁液5.8mLに対して純水、エタノール、DMSOを0.2mL滴下し菌懸濁液中のエタノール、DMSO濃度がそれぞれ1.0%、0.3%となるようにして、その結果生じたβ-galactosidase活性を比較した。図2-4に結果を示す。

図は横軸に純水に対して生じた、つまり化学物質を何も添加しない場合に発現した酵素活性を表している。すなわち試験株において生じた自然発生の変異を表現しているとみてよい。これに対して縦軸にはエタノールとDMSOに対して生じた酵素活性を表した。両者の単相関を計算してみるとDMSO(y)と水(x)では、 $y=0.967x+8.49$ ($r=0.835$)となり、またエタノール(y)と水(x)では、 $y=0.994x-7.52$ ($r=0.885$)となった。両式の傾きから、いずれの溶媒も水の場合に比してほとんど酵素活性に差はないとみなせられる。そこでエタノール、DMSOを溶媒として使用する際には、それぞれ1.0%、0.3%以下の濃度となるよう調製することとした。

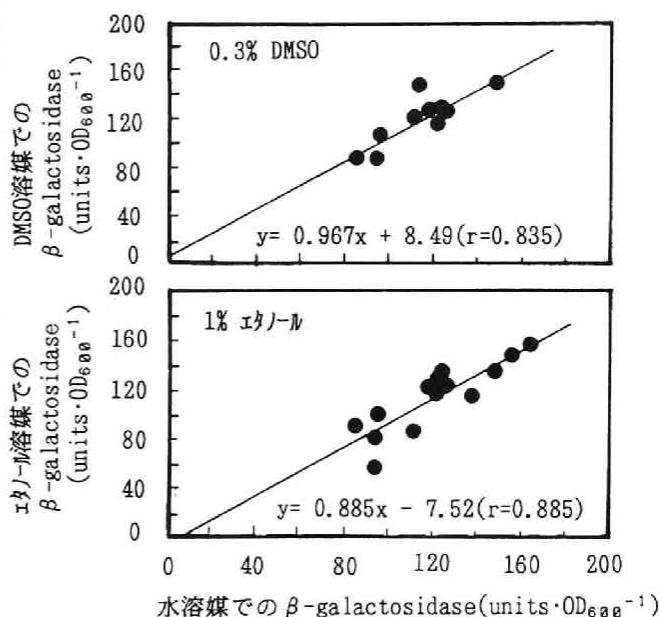


図2-4 溶媒の試験結果に及ぼす影響

2-5 細胞膜破砕液による酵素活性発現効果③

この試験法では、umuDC遺伝子の発現はβ-galactosidase活性量として表現される。この酵素は細胞質内酵素であり、活性量測定に当たっては細胞膜を破砕し酵素を抽出する必要がある。

umuテストの初期の方法³⁾では緩衝液中にいた菌体にトルエン1滴加え、激しく混和し、その後トルエンを温水中にて40分間暖めながら蒸発させて酵素活性を測定するというものであった。

細胞の酵素の抽出法として、酵素の性格やその細胞膜における分布状況により

様々な方法が提案されている。ここでは細胞内の加水分解酵素である β -galactosidase蛋白全てを抽出するという目的のため陰イオン性界面活性剤であるトデシル硫酸ナトリウム(SDS)を適用することにした¹¹⁾。緩衝液(3.6mL)中にいれた化学物質と反応後の菌懸濁液(0.4 mL)に、SDS 100 μ L、クロロホルム 20 μ Lを加え、激しく混和し、ただちに酵素活性を測定した。この方法を代表的な変異原性物質であるAF-2の濃度列に対して測定しトルエン処理した場合の結果と比較したのが図2-5である。AF-2の0~1 mg \cdot L⁻¹の濃度列に対し β -galactosidase活性の発現はトルエン処理に比較してSDS処理が同等もしくは若干高い傾向にあった。この結果より操作の迅速性、簡便性から本研究ではSDS処理を採用することとした。

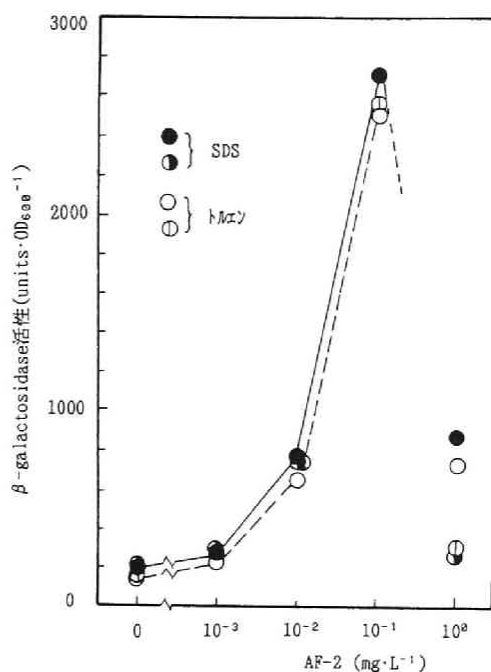


図2-5 細胞膜破砕液の効果

2-6 化学物質との反応時間 ④

umuテストによる化学物質の変異原性の評価方法として小田らは、菌体と化学物質の反応時間を一般に2時間としている。化学物質によってはこの反応時間を調整する必要があるとしながらも、代表的ないくつかの変異原性物質に対しては原則として2時間とした¹²⁾。そして溶媒対照の酵素活性 (units · OD₆₀₀⁻¹, Millerの式)の2倍以上の値を示すものを変異原性陽性と判定する方法を提案している。

これは前掲の図2-3をみてもわかるが、OD₆₀₀が0.2~0.3で化学物質を投与すると、それにより増殖阻害が起こらなかった場合、約2時間で対数増殖期が終了していることから、化学物質とDNAが反応し、umuDC遺伝子の誘発を試験菌の対数増殖期間内に生じさせるための反応2時間

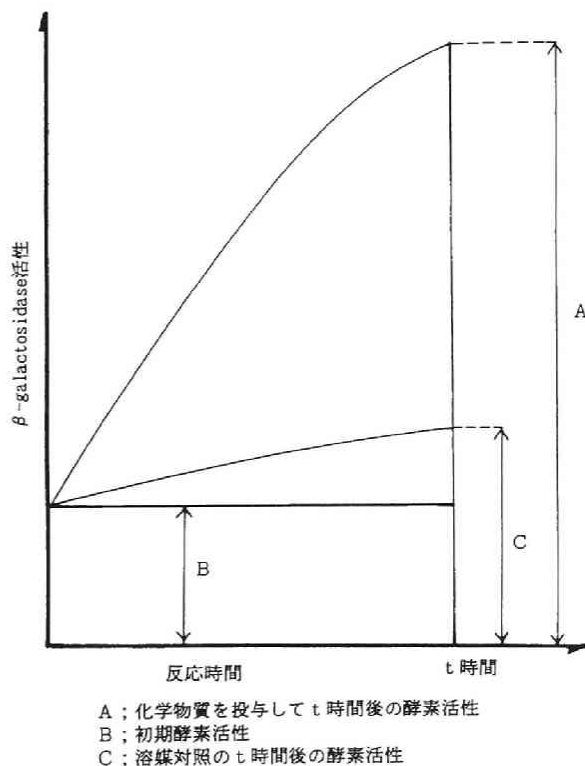


図2-6 umuDC遺伝子誘導の概念図

であることが推察される。この反応2時間は、Ames法がそれが寒天培地上で、2晩の培養でようやく反応結果が現れるという増殖の速度に比して非常に速く、本法の短時間で結果が得られるという長所の一つにもなっている。

ところでいま図2-6に示すように反応時間に対する酵素活性の変化図を想定してみる。被検化学物質と菌体との反応t時間後のumuDC誘発量すなわち酵素活性をA、溶媒と試験菌株との反応t時間後の酵素活性、すなわち陰性対照の経時変化量をC、そして反応初期に菌体の有する酵素活性をBとする。ここで溶媒も菌体と反応して若干の酵素活性を呈するとすれば、t時間後の溶媒対照に対する被検化学物質の持つ酵素活性の相対量は $(A - B) / (C - B)$ で表現するのが適当であると考えられる。

そこでAF-2に関して反応時間に対する酵素活性を示したものが図2-7である。この場合の溶媒はエタノールであるが、溶媒対照(AF-2 = 0 mg・L⁻¹)の酵素活性は反応時間3時間以内ではほとんど変化がない。同様に図2-8にみるように、AF-2の各濃度に関して4時間の反応時間で酵素活性をみたところ、やはり溶媒対照の酵素活性は反応開始初期とほとんど変化がなかった。これらの事実より、被検化学物質の誘発する酵素活性量の増分(A - B)を、溶媒の誘発する酵素活性量の増分(C - B)と比較して遺伝毒性強度を評価することは難しいことがわかった。そこで本研究では、被検化学物質の酵素活性量の増分(A - B)の、溶媒対照の酵素活性量(C = B)に対する比 $(A - B) / B$ の大きさをもって遺伝毒性強度の評価尺度とすることとした。遺伝毒性の判定はこの値が1を越えた場合を陽性とするれば、一般にumuテストにおける陽性判定が溶媒対照の2倍以上としていることと同様の尺度となる^{9) 12)}。ここではこの評価尺度をもってumuテストの判断基準とした。

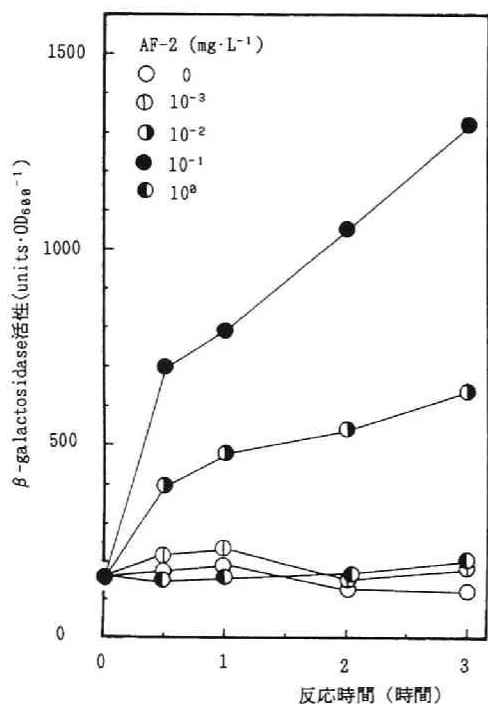


図2-7 AF-2によるumuDC遺伝子の誘導 (1)

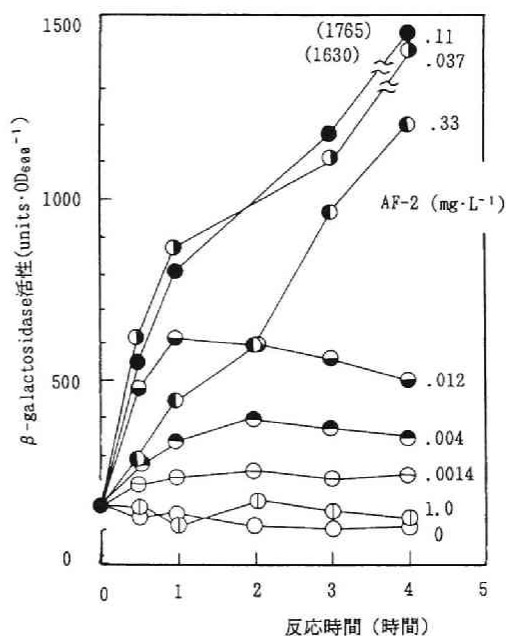


図2-8 AF-2によるumuDC遺伝子の誘導 (2)

この遺伝毒性 $(A - B) / B$ で図2-8のAF-2に対する酵素活性の誘発量を表したものが図2-9である。これによれば、反応開始2時間後で、濃度 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以外の濃度列は $(A - B) / B$ が1を越え陽性を示している。濃度 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の場合には細菌細胞が化学物質のために、DNAの修復速度がその損傷の速さより遅かった等の理由により細胞死を起こしていることがわかる。

2-7 菌体量当りの化学物質質量 ⑤

umuテストは液体中に溶解している化学物質の濃度効果を評価できる利点を有していると考えられる。通常のバクテリアアッセイでのdose responseにおいてはdoseは試験菌液中の化学物質の濃度、もしくはAmes法ならば平板プレートに対し、化学物質質量 μg を与えて表示される。しかしながら本研究では、dose responseを化学物質の濃度 $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ から判断するよりも、試験菌株の菌体数当りの被検化学物質質量で表記した方が、生物に対する毒性物質の負荷による影響を知る立場からはより好ましいと思われる。

そこでまず、菌体濃度相当量として採用している OD_{600} と試験菌株の生菌数との関係を求めたものが図2-10である。図は2回の実験の結果を併せて示している。生菌数の測定はTGA培地に寒天1.5%添加した寒天培地を使用した。図より直線の傾きを最小2乗法で計算すると、

$$\text{菌体数} (\times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}) = 6.89 \times \text{OD}_{600} - 1.03 \quad \text{となる。}$$

前節で求めたAF-2に関して横軸に投入量、つまり OD_{600} 当りの濃度を取り、それらに対する反応2時間後の β -galactosidase活性を求めると図2-11のようになる。同図中には溶媒対照の平均値を表してある。この図からAF-2の投入量が $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ $\cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ のときに酵素活性量は最大値を示し、この値を越える投入量を与えると

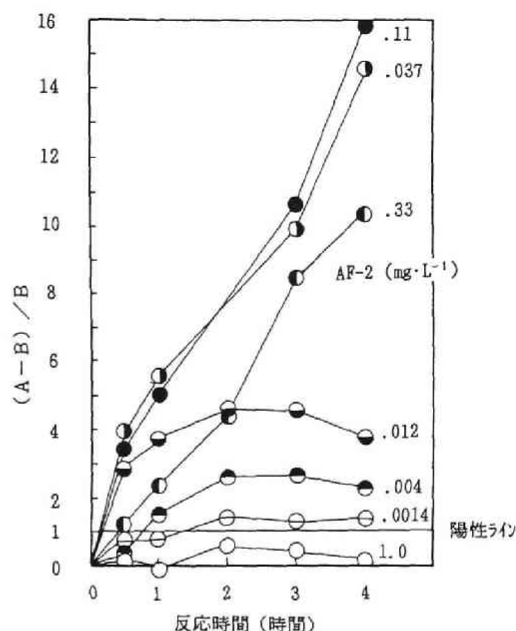


図2-9 AF-2による遺伝毒性強度 $(A-B)/B$ の変化

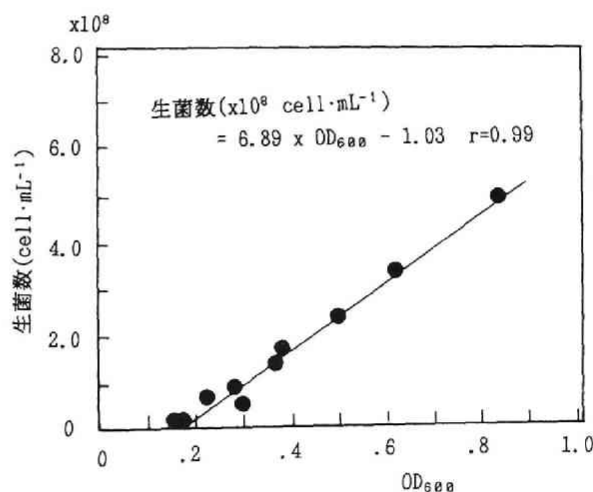


図2-10 試験菌株の OD_{600} と生菌数の関係

細胞死の傾向が現れることがわかる。この $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ という値は、前述の吸光度と生菌数の関係と、AF-2の分子量(248.19)から、菌体 1 cell に対して AF-2 を 1.9×10^7 分子与えたときに *umuDC* 遺伝子の発現が最大となることに相当する。また AF-2 が非常に低濃度では遺伝毒性を定量できないことが示され、*umu* テストにおける陽性判定にはある程度の化学物質の量が必要であることが示唆される。

図2-12にはこれも代表的な変異原陽性物質とされる2AA(

2-Aminoanthracen)の投入量に対するdose responseを表した。代謝活性有りの系に関しては $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ 以上の投与量で $(A - B) / B$ が1以上、つまり溶媒対照の2倍以上を示した。この投与量は細胞当りに換算して $5.7 \times 10^7 \text{ molec} \cdot \text{cell}^{-1}$ となる。

AF-2投入量に対して β -galactosidase活性すなわち *umuDC* 遺伝子の発現の速度をプロットしたのが図2-13である。同図から $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ で最大の発現速度が観察された。このように *umuDC* 遺伝子の発現速度はAF-2の投与量に関係し dose responseが得られることがわかり、同様の傾向は他の化学物質でもみられることが推定される。

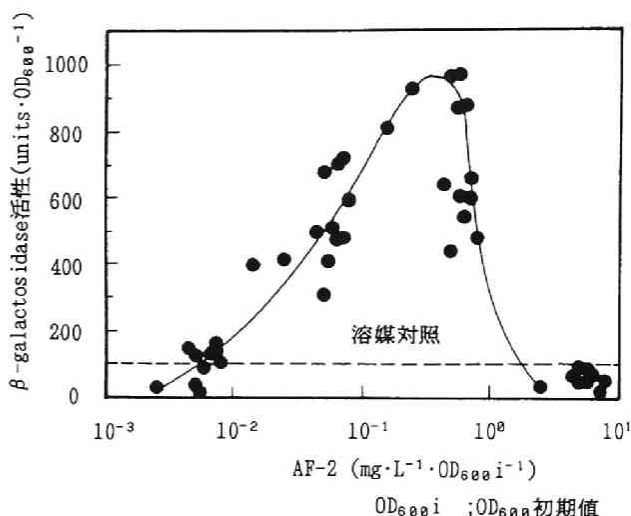


図2-11 AF-2の濃度効果

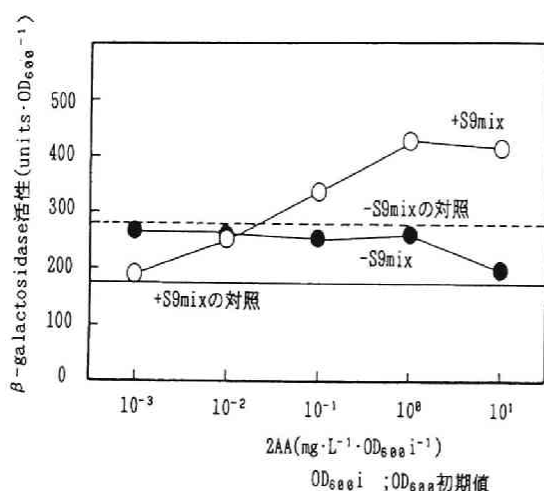


図2-12 2AAの濃度効果

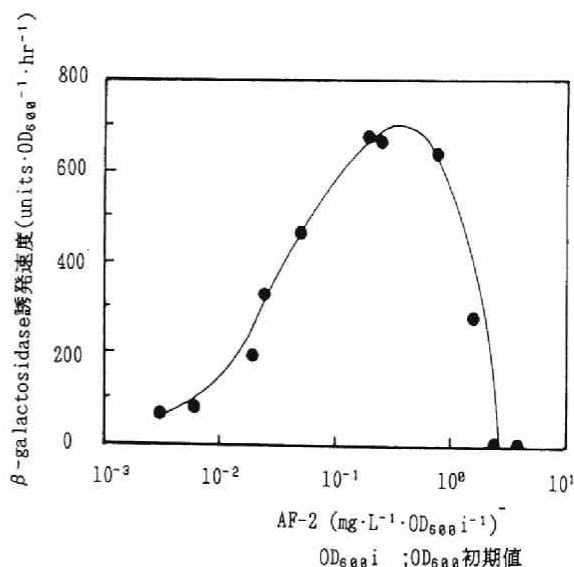


図2-13 AF-2に対する *umuDC* 遺伝子の発現速度

2-8 まとめ

本節で得られた成果の主要なものを以下に記す。

①開発された umu テストの迅速化と簡易化を検討し、結果としては測定方法は図2-14に示すフローにまとめられる。主要改訂点は振とう数の増加による前培養時間の短縮化、細胞膜破砕に界面活性剤 SDS を用いることである。このフローに従えば、凍結菌体を復水して一晩培養し、翌日の9時に前培養を開始し、酵素活性の測定は午後2時頃には完了できる。当然試料数によって多少完了時刻に差はでき、迅速測定が実現できる。

②被検化学物質の溶媒として試験菌懸濁液中での1%エタノール、0.3%DMSOに対するβ-ガラクトシダーゼ誘導を検討した結果、水の場合とほぼ変わらなかった。溶媒対照のβ-galactosidase誘発（すなわち、umuDC遺伝子誘発）の変化を時間的に検討したが、3~4時間の反応時間内ではほとんど変化がなく一定値を示した。

③各反応時間内において、溶媒対照の値をベースと考えてもよいことがわかった。そこで遺伝毒性強度として被検化学物質の酵素活性量の増分(A-B)の、溶媒対照の酵素活性量Bに対する比(A-B)/Bの大きさをもって評価することとした。

④umuテストは液体培地による測定法なので、培養液中における菌体量に対する被検化学物質という単位で、濃度効果を検討することを提示した。試験菌株の生菌数は対数増殖期において、その吸光度当りで $(6.89 \times OD_{600} - 1.03) \times 10^8$ cells/mLであった。またAF-2、2AAという代表的な変異原物質でも非常に低濃度ではumuテストで陽性を検知できず、陽性と判断するにはある程度の投与量が必要ながわかった。

⑤AF-2において投与量に対するumuDC遺伝子の発現速度をみたところ、発現速度にもdose responseが得られた。このことより遺伝毒性の指標として、DNA修復の速さ、すなわち突然変異を誘発する速度を用いて評価しうることが推察された。

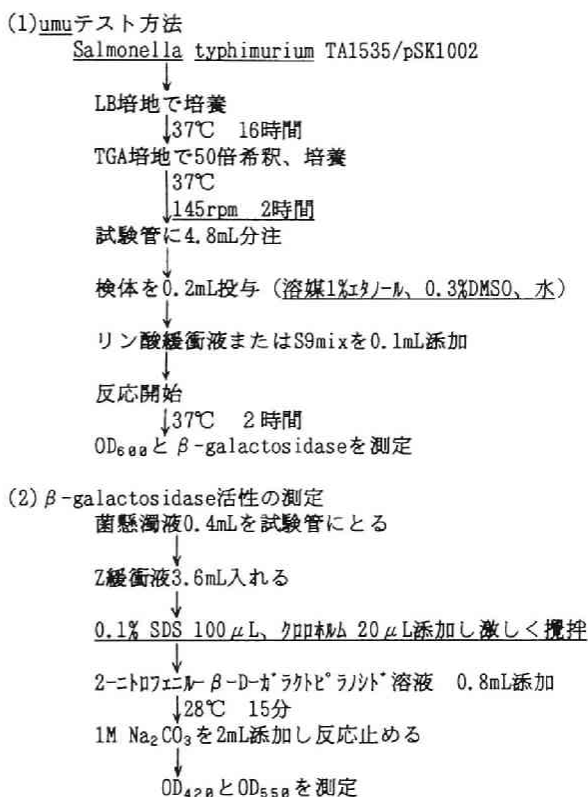


図2-14 umuテスト方法論（改訂後）

第3節 umuテストにおける遺伝毒性誘発現象の評価

3-1 概説

前節ではumuテスト法の使用法に関し検討を行った。ところで本試験法は前節で示したように、その指標がumuDC遺伝子の誘発量を菌株相当量で除して表している。umuテストに限らず、Amesテスト、Rec-assayはもとより、哺乳動物細胞を用いた系でも、培養細胞系を用いた遺伝毒性や変異原性試験では、多くの場合直接化学物質がDNAに損傷を与えるのではなく、それらが酵素群によって代謝を受け活性化される。また化学物質の細胞膜透過や、細胞質内拡散、DNAへの損傷の形態なども化学物質により差異を持つものと推察される。

また発癌に閾値なしといわれるように、ごく微量の化学物質でもDNAに損傷を与えうるし、与えればそれが突然変異のトリガーとなりうる。しかしながらスクリーニング法によってはある濃度以上でないと変異が判定できないし、それが各々の方法の感度であり、限界でもある。

本節ではumuテストがどのような現象を評価しているのかを明らかにするため、経時的に被験物質を投与した培養細胞を採取し、その増殖と酵素活性、umuDC遺伝子の誘発、さらには化学物質の変化を追跡、検討することとし、その水環境化学物質への適用のための測定条件の明確化を目的とした。

3-2 実験方法

3-2-1 umuDC遺伝子の測定

実験に用いた試験菌株は前節で用いた *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 (アンピシリン耐性株) である。

培地及び緩衝液も前節2-2で示したLB培地、TGA培地、Z緩衝液及びS9mixを使用している。

3-2-2 Dehydrogenase活性の測定

脱水素酵素 dehydrogenase は、呼吸鎖 (呼吸回路) の初段階において、基質の水素を脱水素してNADに移行する役割を果たす。この点から dehydrogenase 活性の発現は、増殖にともなうエネルギー獲得のための基質分解活性を表していると考えてよい。測定は下水試験方法¹³⁾記載の方法によった。

菌懸濁液10mLに0.5%塩化トリフェ

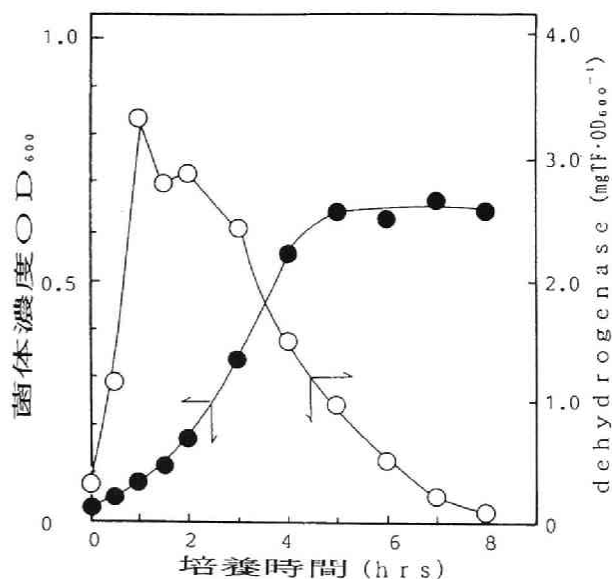


図2-15 試験菌株の増殖曲線と脱水素酵素活性

ニ-ルテラゾリウムを1mL加え、さらに0.5%亜硫酸ナトリウム3滴添加し、20℃暗所に1時間放置する。その後、10000rpmで10分間遠心分離し、上澄水を除く。これにエタノールを10mL加えよく攪拌し、10000rpmで10分間遠心分離し、上澄水のOD₄₈₈を測定した。標準液は、20mg・L⁻¹トリフェニルルマゾン(TF)で検量線を作成した。dehydrogenase活性はmgTF・OD₄₈₈⁻¹で表記した。

試験菌株 *S. typhimurium* に対してその増殖曲線と dehydrogenase 活性を測定した例を図2-15に示す。dehydrogenaseの誘発は細胞の増殖に先行し、活性がピークに達すると、対数増殖期にはいることが知れる。

3-2-3 アデノシン三リン酸 (ATP)

ATPは菌体の有するエネルギー量を測定するため用いた。その測定は、ルシフェリンとルシフェラーゼがマグネシウムイオン存在下でATPと反応して発する傾向を測定することで決められた。ルシフェリン・ルシフェラーゼ (LUMAC製)は0.025M HEPES緩衝液 (pH7.75)に溶かされ、ATP標準試薬 (オリエンタル酵母製)及び試料は、酵素液と1:1に混合され、60秒間の発色の積算値から含有ATP量を算定した。試料細胞中のATPの抽出は、試料をHEPES緩衝液で10倍に希釈し、これを98℃で3分間煮沸した後、氷中で急冷して抽出した。

3-2-4 培養方法 (化学物質との反応)

LB培地で37℃、一昼夜培養した試験菌株を、TGA培地で50倍に希釈し、37℃、145rpm、2時間振とう培養する。これらに被験化学物質を適当な濃度に調整して投入した。この液を10mLバイアル瓶に分注し、各々テフロンシートとゴム栓で密栓した。これを37℃、145rpmで振とう培養し、経時的に各濃度1本ずつを分析に供した。このうち5.0mLはOD₄₈₈ (菌体濃度相当)測定後、dehydrogenase活性を測定した。0.4mLはβ-galactosidase活性を測定するのに供した。

細胞内外の化学物質を測定する場合には、細胞外の化学物質はバイアル瓶に注射器で0.5%亜硫酸ナトリウム溶液を打ち込み、呼吸活性を停止させて、これを20℃恒温で1時間以上放置したのち、ヘッドスペース法でガスクロマトグラフィ (GC-ECD) で測定した。細胞内外全体の化学物質を測定するのは、注射器でバイアル瓶にSDSとクロホルムを打ち込み、強攪拌後、同様にしてヘッドスペース法で測定した。この両者の差を細胞内 (細胞壁の存在するものも含む) 化学物質とした。

3-2-5 被験化学物質及び検定濃度

実験に供した化学物質及びその投入濃度は以下に示すとおりである。

(単位はmg・L⁻¹)

m-ジクロロベンゼン (ナライテック製)

-S9mix系 3, 10, 30, 100 : +S9mix系 10, 30, 100

クロホルム (和光純薬製)

-S9mix系 30, 100, 300, 750 : +S9mix系 90, 300, 900

プロホルム (ナライテック製)

-S9mix系 3, 10, 30, 50, 75, 100 : +S9mix系 3, 10, 30

ホルムアルデヒド（和光純薬製）

-S9mix系 10, 30, 50 : +S9mix系 10, 30, 100

グリオキサール（和光純薬製）

-S9mix系 30, 100, 300 : +S9mix系 30, 100, 300

m-クロロフェノール（和光純薬製）

-S9mix系 3, 10, 30, 100

3-3 塩素処理生成物(m-ジクロロベンゼン, クロホルム, ブロホルム)の遺伝毒性誘発

3-3-1 m-ジクロロベンゼン

図2-16に-S9mixでのm-ジクロロベンゼンを与えた場合の増殖特性を示した。LB培地の菌懸濁液をTGA培地に希釈後、培養して2時間ののち、dehydrogenaseの誘導により、菌は対数増殖期に入ったことがわかる。

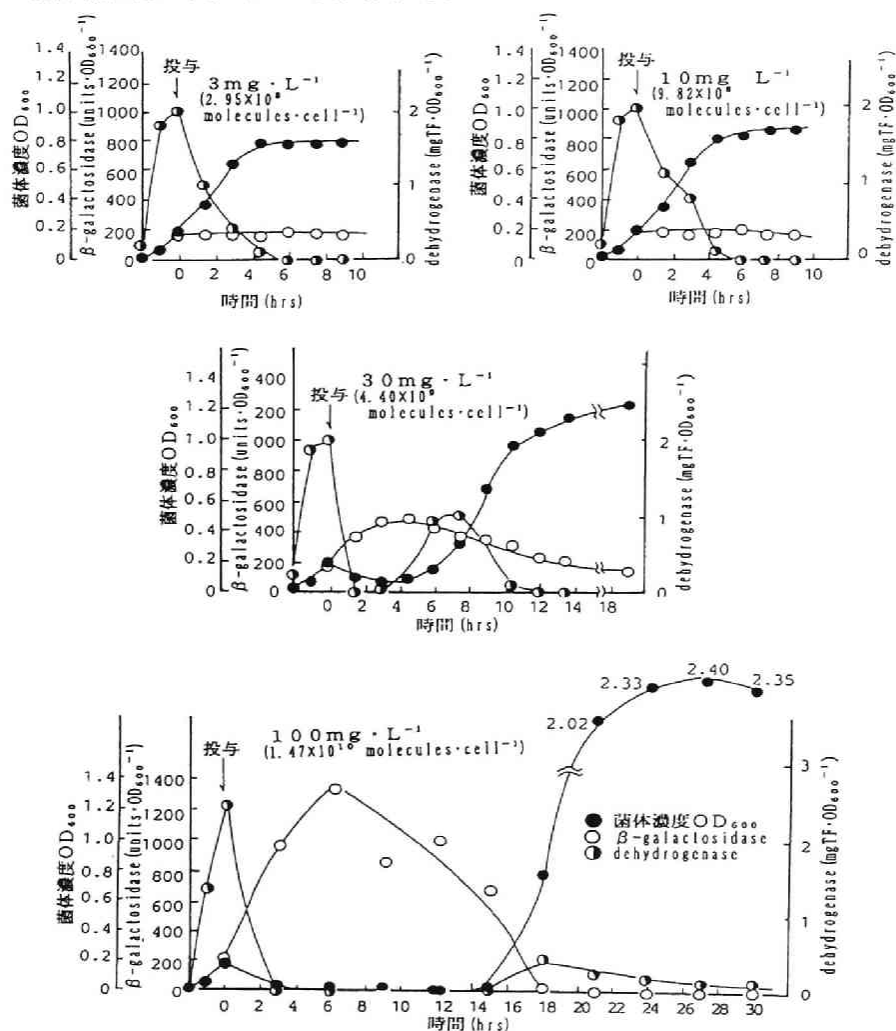


図2-16 SOS修復反応 m-ジクロロベンゼン(-S9mix)

このとき、*m*-ジクロロベンゼンを培地中に $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 添加すると、菌は増殖を一時停止した。この化学物質の投与濃度を菌体当りの投与分子数で表すと $1.47\times 10^{10}\text{ molecules}\cdot\text{cell}^{-1}$ となる。以下、投与濃度表示とともに（ ）内に数値を示す。菌の増殖停止後、 β -galactosidaseの誘導で示されるように、*umuDC*遺伝子の誘発により、DNAの修復反応が起こっていることがわかる。この修復反応は約14時間継続し、その後、再びdehydrogenaseの誘導とともに、菌体が増殖を開始することがわかる。このとき細胞は非常な増殖を示し、 OD_{600} で2.0を越えたことが観察できた。この β -galactosidaseの誘発量及び菌体の再増殖に至るまでの遅滞時間は、投与した*m*-ジクロロベンゼンの量を減じると少なくなり、 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (4.40×10^9)では、投与後約6時間を経てDNA修復反応が終了し、菌体の再増殖が始まっている。 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (9.82×10^8)、 $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.95×10^8)と*m*-ジクロロベンゼンの量を減じると、ほとんど修復遺伝子の誘発量は検知できず、菌体にも増殖の一時停止期間は認められない。

+S9mixの場合を図2-17に示す。 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.95×10^{10})投与すると、菌体増殖は一時停止し、*umuDC*遺伝子の誘導が認められ、DNA修復反応が起こっていた。菌体の再増殖は約29時間の遅滞後始まった。 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5.85×10^9)、 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.95×10^9)とした場合は、*umuDC*遺伝子の若干の誘導があったものの、遅滞期はほとんど見られなかった。

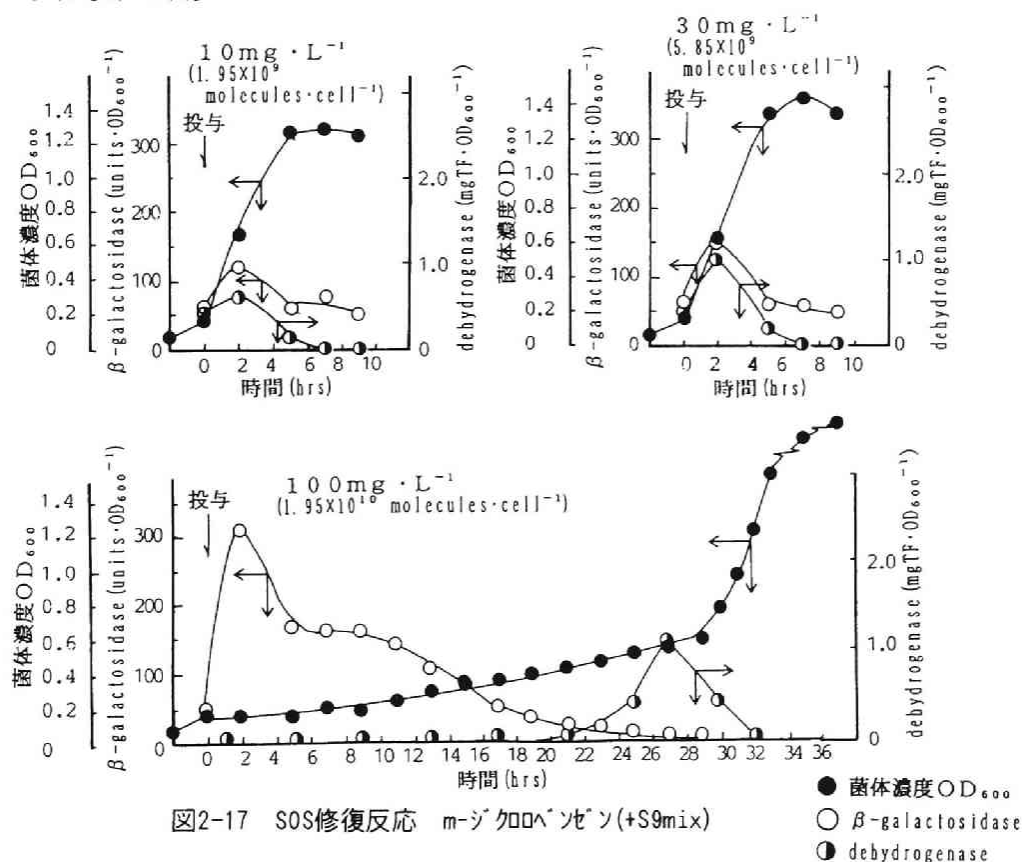


図2-17 SOS修復反応 *m*-ジクロロベンゼン(+S9mix)

3-3-2 クロロム

図2-18に-S9mixでのクロロムを投与した場合の増殖特性を示した。一般にクロロムはAmes法では変異原性が検知されないとされている。このDNA修復試験においては、 $750\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.81×10^{11})と比較的高濃度のクロロムを与えると、umuDC遺伝子の誘発が投与後6時間を経て始まり、18時間後に最大を示していることがわかる。この間、菌体は増殖を停止し、24時間後、dehydrogenaseの誘発とともに増殖を再開している。クロロムの投与量を減じると、増殖の遅滞時間は短くなり、umuDC遺伝子誘発量も減じている。

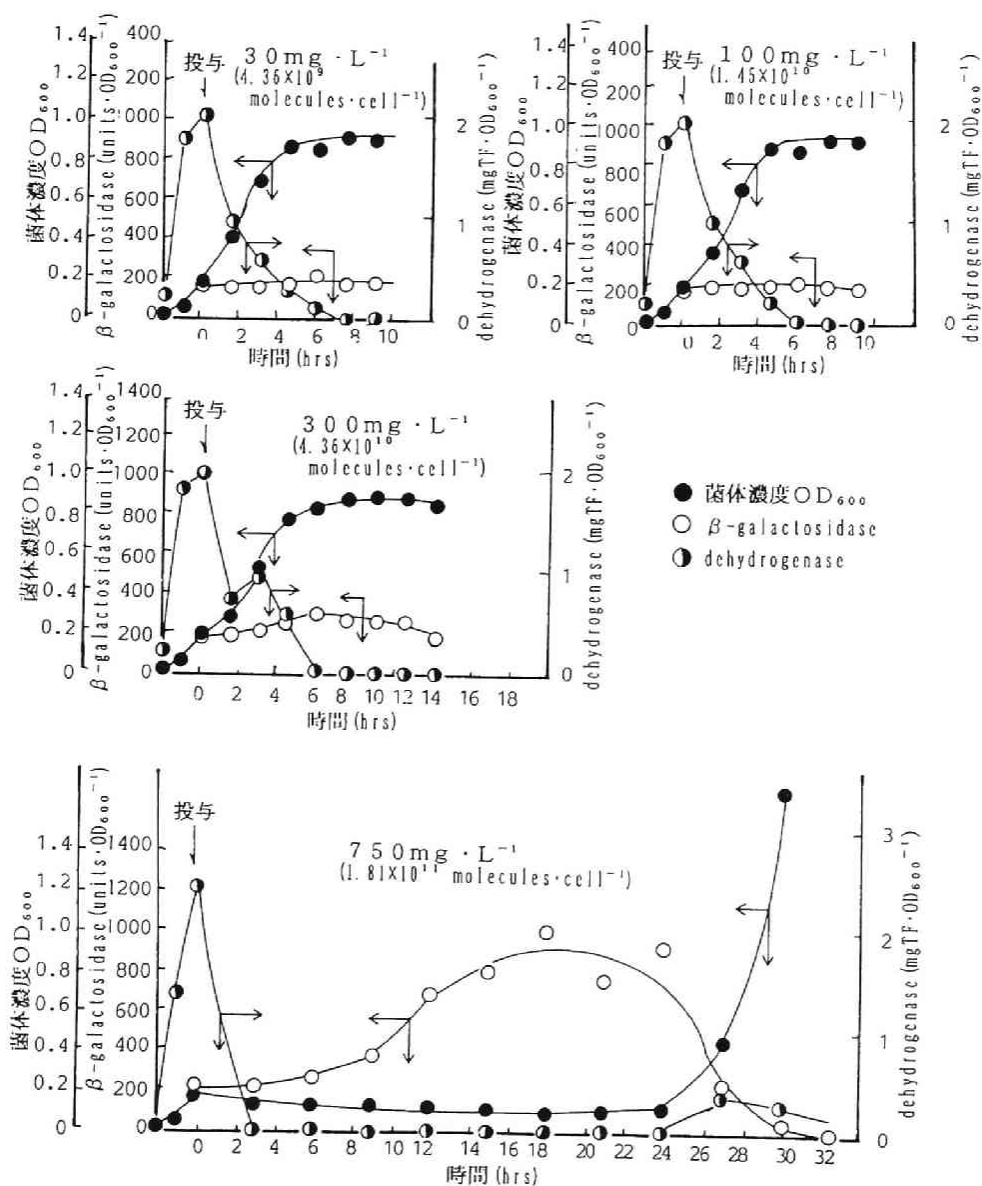


図2-18 SOS修復反応 クロロム(-S9mix)

+S9mixの結果を図2-19に示す。900mg・L⁻¹ (2.17×10¹¹) のカドミウムを与えると、約5時間は、DNAの修復に要することがわかる。投与量を300mg・L⁻¹ (7.22×10¹⁰)、90 mg・L⁻¹ (2.17×10¹⁰) と減じると、この修復時間はほとんどみられなくなった。

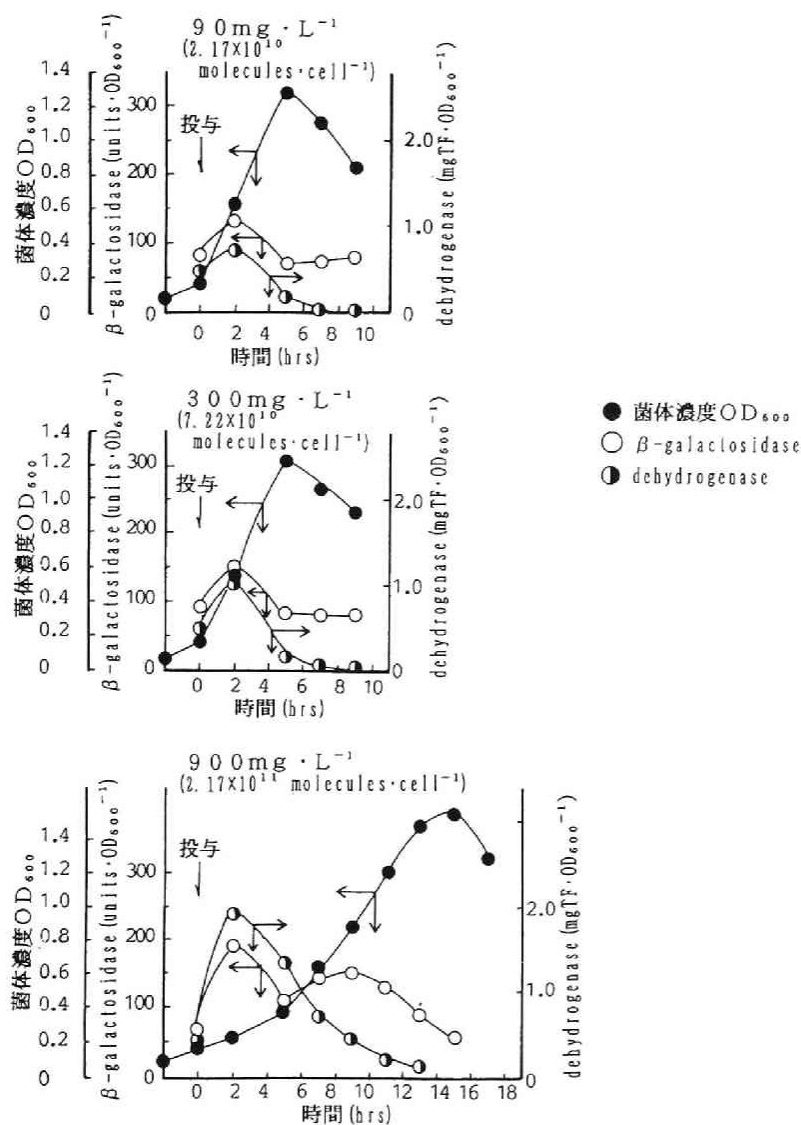


図2-19 SOS修復反応 カドミウム(+S9mix)

3-3-3 フロホルム

図2-20にフロホルムを投与した-S9mixの結果を示す。フロホルムは $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5.71×10^{10})以下の比較的低濃度でSOS修復反応を強く示す。投与と同時に菌体増殖は一時停止するが、umuDC遺伝子は、前記のm-ジクロベンゼンやクロホルムと異なり、ただちに誘発されず、遅れて発現している。むしろumuDC遺伝子発現に併行して菌体増殖が再開している。このことは、一連のSOS修復反応の中で、umuDC開裂に至るまでのプロセスに時間を要しているか、あるいは、フロホルムのDNA鎖上の損傷部位が増殖に直接関わらない箇所であるのかもしれない。umuDCの誘発はフロホルム $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.05×10^8)でほぼ認められなくなっている。

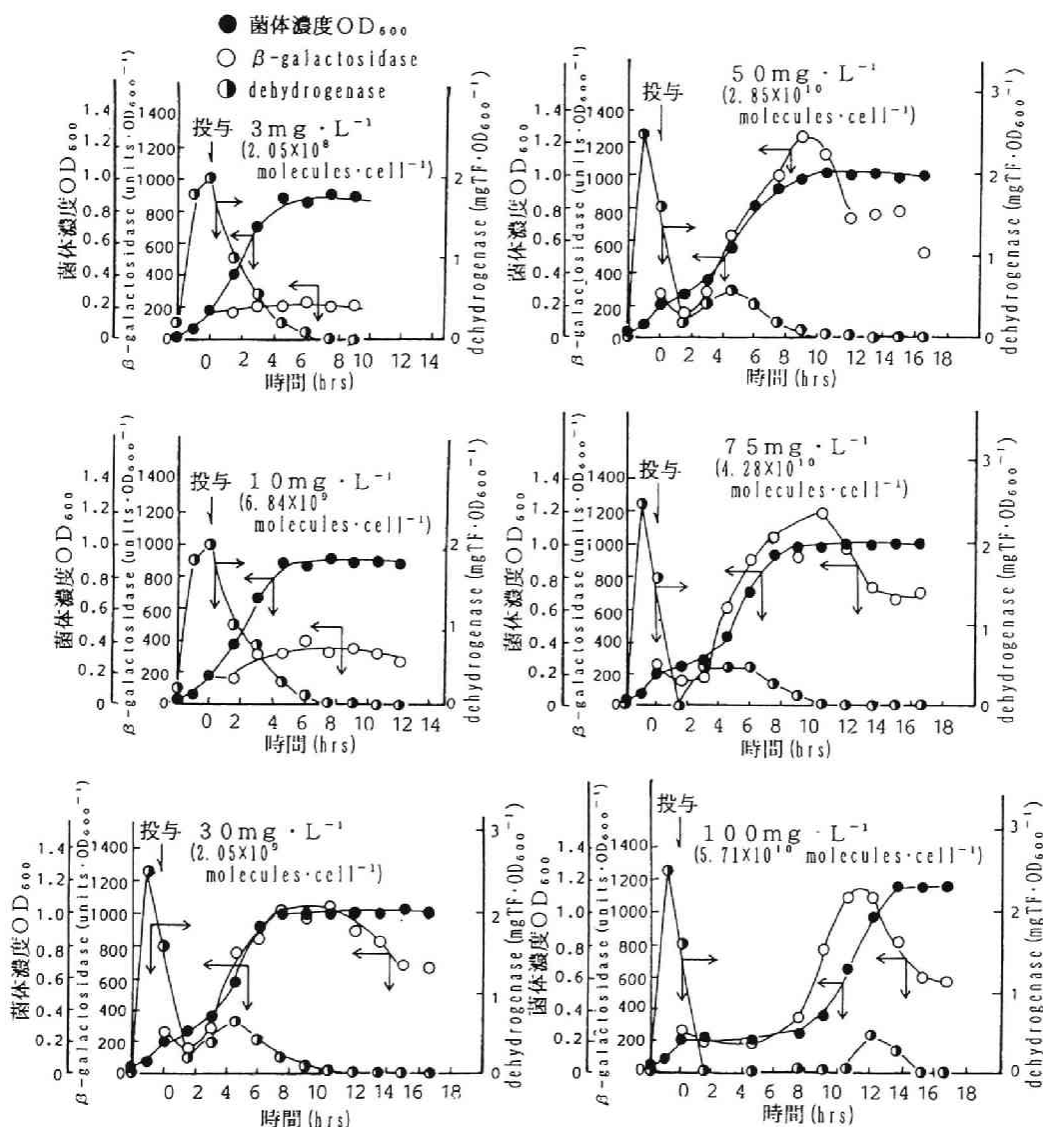


図2-20 SOS修復反応 フロホルム(-S9mix)

+S9mixで、比較的低濃度の場合を図2-21に示した。30mg・L⁻¹ (5.05×10⁹)で増殖の遅滞期はほとんどみられず、β-galactosidase活性も高々200units・OD₆₀₀⁻¹と、-S9mixに比べて低い。このことはP450酵素群等により、ある程度損傷性の小さい物質に変換された可能性があると推測される。

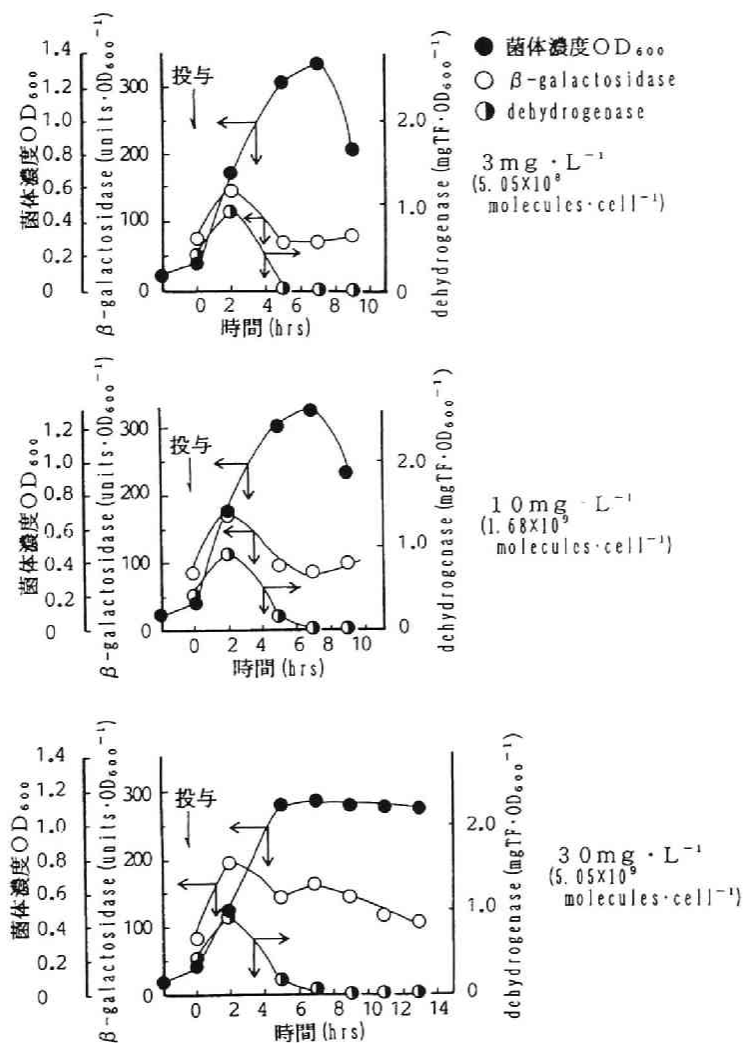


図2-21 SOS修復反応 アフラトキシンB₁(+S9mix)

3-3-4 濃度効果

図2-22に上記塩素処理生成物3種を与えた場合の菌体増殖における遅滞期の長さを、投与した濃度に対して表した。遅滞期は各時間における OD_{600} を片対数紙上にプロットし、最大の傾きを持つ直線上にはいるまでの時間とした。各物質とも遅滞期の長さ、したがってDNA修復に要した時間は、投与濃度が高いほど長いことが示唆される。S9mixの添加により、プロホルム、クロホルムは遅滞期が短縮されたが、m-ジクロロベンゼンは $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (+S9mix 1.95×10^9) 投入時に、29時間の遅滞期を示し、代謝活性化により、さらに修復に時間を要するようになったことがわかる。

同図中で遅滞期が0時間、すなわち化学物質によるDNA修復に要する時間がほとんど認められなくなる濃度は、-S9mixで、m-ジクロロベンゼンが $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.95×10^9)、クロホルムが $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.45×10^9)、プロホルムが $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (6.84×10^9)であり、必ずしも単純にcell当りのdose量で規定できないが、濃度表示に比べて各々の投与量がかかり近い値で整理できる。+S9mixでは、m-ジクロロベンゼンが $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5.89×10^9)、クロホルムが $300\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (7.22×10^9)、プロホルムは最大 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (5.05×10^9)の投与でも遅滞期はなかった。プロホルムとm-ジクロロベンゼンはクロホルムに比し、比較的低い濃度で化学物質投与による遅滞期を示し、毒性のより強いことを表している。

図2-23は同様に各物質の濃度に対して β -galactosidaseの誘発速度、すなわちumuDCの誘発速度を示した。速度の算定は各時間に対する β -galactosidase活性を片対数紙上にプロットし、最大の傾きを示す直線を求め、これより算出した。-S9mixの場合、m-ジクロロベンゼン、プロホルムは $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (各々 4.40×10^9 , 2.05×10^9)投入で各々約0.20, 0.25 hr^{-1} で最大の誘発速度を示した。これに対しクロホルムは $300\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (4.36×10^9)という高濃度において0.05 hr^{-1} の誘発速度を示し、他の2種の化学物質に比せば、SOS

修復反応の発現の速さは小さいとみることができる。+S9mixの場合も化学物質の投与量に応じて誘発速度が大きくなる効果のあることがわかった。いずれの物質にも、ある濃度においては代謝活性があったほうがumuDCの誘発が大きい場合のあ

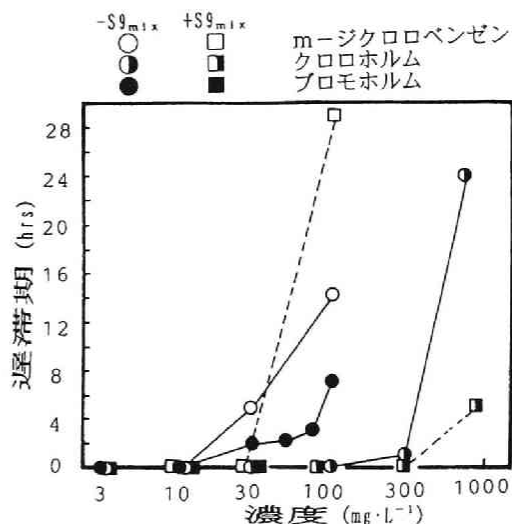


図2-22 遅滞期の濃度効果

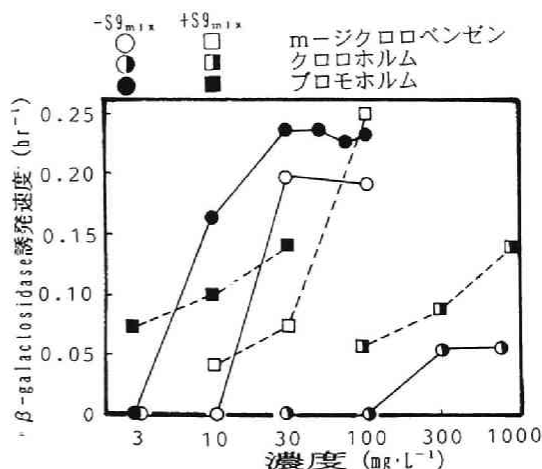


図2-23 umuDC遺伝子誘発速度の濃度効果

ることがわかる。検討した濃度列の中では誘発速度が0、すなわちumuDCの発現がほぼ認められなかった濃度値は、-S9mixでm-ジクロロベンゼンが $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (9.82×10^8)、クロホルムが $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.45×10^{10})、ブロホルムが $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.05×10^8)であった。ここでもブロホルムはクロホルムに比して、比較的遺伝毒性の強いことが示されている。

図2-24には、 β -galactosidase 活性の各投与濃度での最大発現量を示してある。ここで最大発現量は、ある投与濃度において誘発された最大の β -galactosidase活性 (units $\cdot 0D_{600}^{-1}$) Aと、溶媒対照値 Bから $(A-B)/B$ で表現した。遺伝毒性陽性を示す指標として $(A-B)/B=1$ 以上とすれば (A値がB値の2倍以上)、陽性閾値を示すのは、-S9mixで、m-ジクロロベンゼン $20\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、ブロホルム $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、クロホルム $350\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度である。+S9mixで、m-ジクロロベンゼン $45\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、ブロホルム $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、クロホルム $900\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 程度である。P4

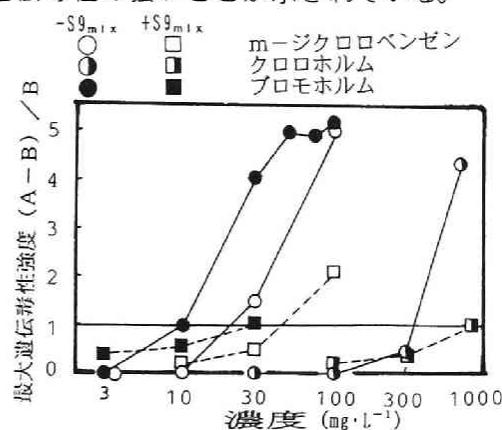


図2-24 最大遺伝毒性強度の濃度効果

50酵素群により、陽性閾値は各物質とも増加している。また最大の $(A-B)/B$ 値も、S9mix添加で減じている。このことは、これら3物質に対しては、P450酵素群により遺伝毒性強度がある程度減じうること示している。

このように各物質とも増殖阻害を含む遺伝毒性を示すのは、大抵的には菌体細胞当りの投与分子数で $10^8\sim 10^{11}$ molecules $\cdot\text{cell}^{-1}$ のオーダーにあるときに最大毒性を呈するといえる。このことは、DNAの損傷に化学物質によって特定の作用部位があり、その作用部位の周辺に $10^5\sim 10^{12}$ 分子以上が存在する必要がある、この数が個々の化学物質によって一定とされていること¹⁴⁾に鑑みると、概その範囲にある数値であると考えられる。

3-4 オゾン処理生成物(ホルムアルデヒド、グリオキサール)の遺伝毒性誘発

3-4-1 ホルムアルデヒド

-S9mixの結果を図2-25に示す。ホルムアルデヒド $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.07×10^{10})以上を与えたところ、12時間の反応時間内では菌体増殖は認められなかった。なお確認のため菌懸濁液を一昼夜培養を続けたが菌の増殖する傾向は全くみられず、溶菌が生じ死に至ったものと考えた。SOS修復反応は $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.24×10^{10})で強く示された。この場合のumuDCの発現は前記ブロホルムと同様、化学物質の投与直後ではなく、約4時間程度遅れ、またumuDC誘発にともない菌体の増殖が観察できた。

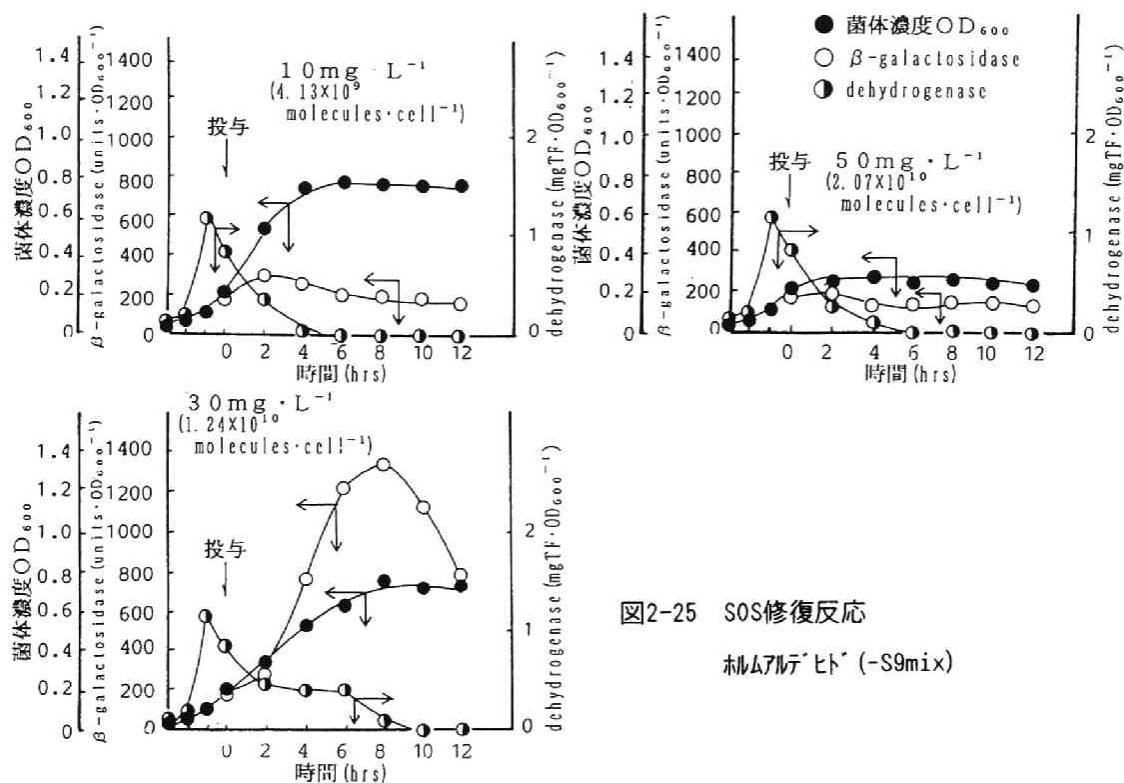


図2-25 SOS修復反応
ホムアルデヒド⁺ (-S9mix)

図2-26は+S9mixでの反応特性を示したが、菌体増殖、umuDC誘発は-S9mixの場合とほぼ同様の結果を示した。ホムアルデヒド⁺はP450酵素群によりその毒性が減じることはないことがわかる。

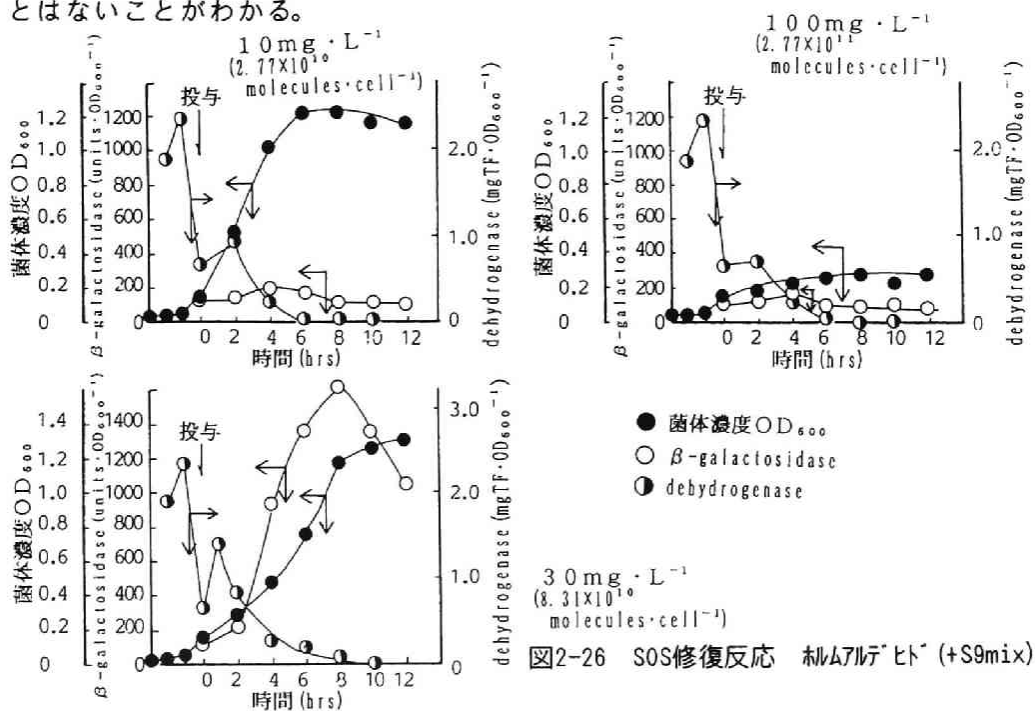


図2-26 SOS修復反応 ホムアルデヒド⁺ (+S9mix)

3-4-2 グリオキサール

図2-27に、グリオキサールの-S9mixの反応特性を示した。300mg・L⁻¹ (4.30×10^{11})では10時間の反応時間内では菌体の増殖はみとめられず、dehydrogenase活性も全くみられなかった。100mg・L⁻¹ (2.98×10^{10})で投与後6時間を経て、umuDC誘発が認められているが、同時に菌体増殖は、ほとんど遅滞期もなく開始していることがわかる。

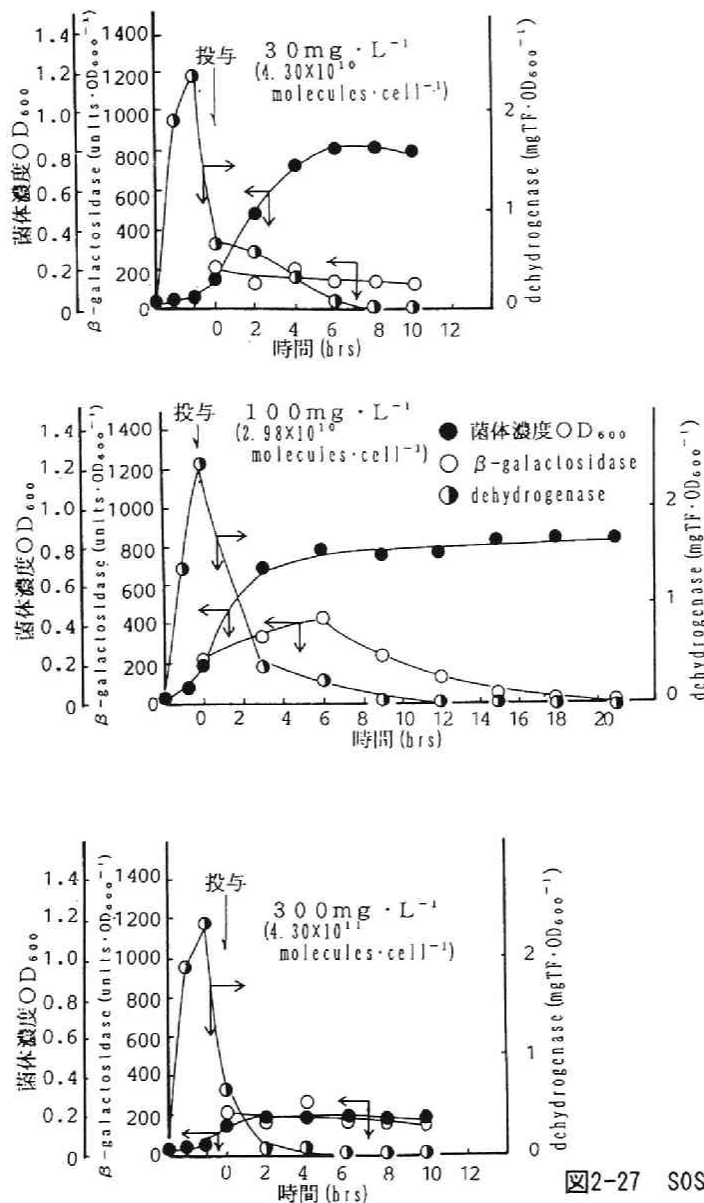


図2-27 SOS修復反応

グリオキサール(-S9mix)

+S9mixの結果を図2-28に示した。100mg・L⁻¹ (2.98×10^{10})の投与の場合に、投与後4時間でumuDC誘発が認められ、同時に菌体増殖がみられる。一方、30mg・L⁻¹ (2.20×10^{10})の場合には遅滞期がほぼみられず菌体増殖を開始している。

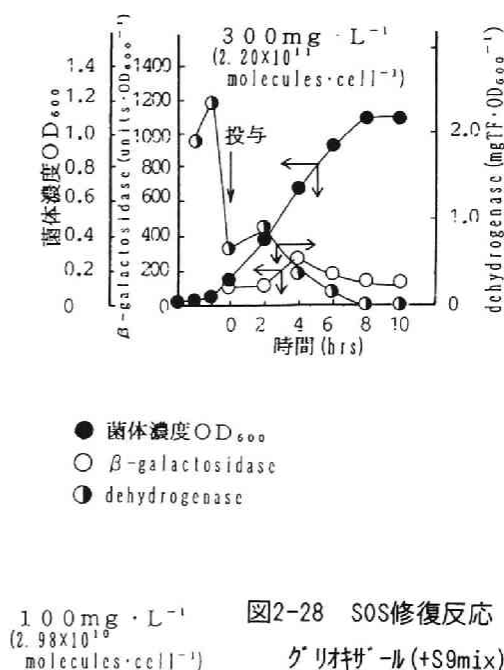
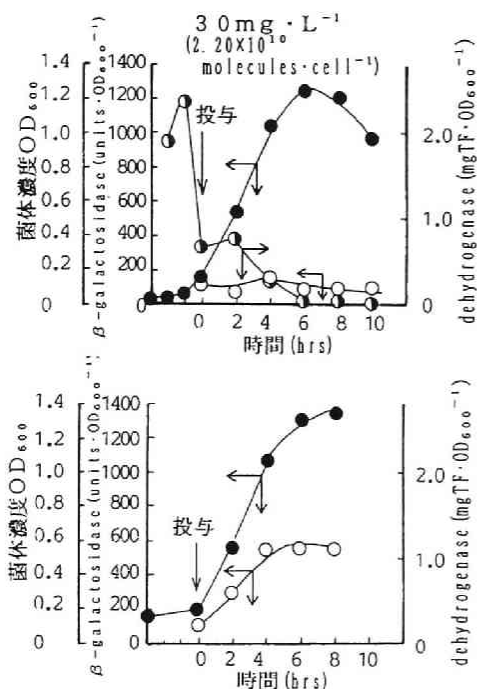


図2-28 SOS修復反応
グリオキサール(+S9mix)

3-4-3 濃度効果

ホルムアルデヒド、グリオキサールに関してその遅滞期の長さを検討したが、投与して検討した濃度域すべてにおいて、遅滞期はほぼ0時間であり、化学物質の投与後も、菌体は増殖を一時停止しなかった。このことは、DNA修復のための $umuDC$ 遺伝子の誘発がみられることから、DNA鎖上の損傷が増殖に関与していない部位であったのかもしれない。

図2-29に β -galactosidaseの誘発速度を示した。ホルムアルデヒドは $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.24×10^{10})で最大の誘発速度を示し、その修復能が速いことを示している。一方、グリオキサールは $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.98×10^{10})で最大を示した。いずれの物質もS9mixを加えることで誘発速度が上昇している。

図2-30には、各濃度での遺伝毒性の最大の強度 $(A-B)/B$ を示してある。 $+S9mix$ とともに、ホルムアルデヒドは $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.24×10^{10})で、グリオキサールは $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.98×10^{10})で最大値を示している。陽性閾値は、ホルムアルデヒドは $+S9mix$ とともに約 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、グリ

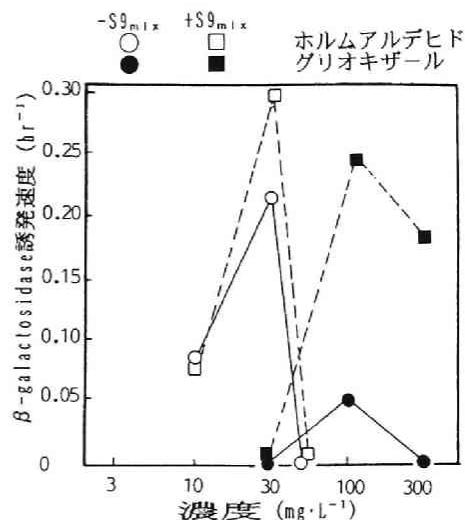


図2-29 $umuDC$ 遺伝子誘発速度の濃度効果

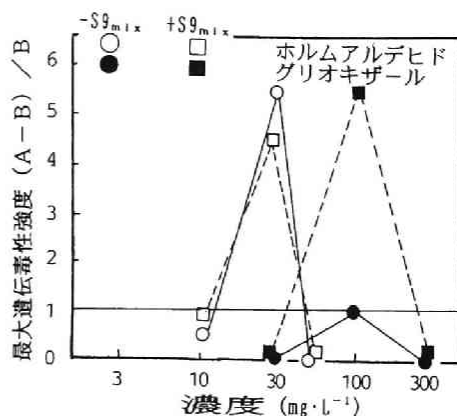


図2-30 最大遺伝毒性強度の濃度効果

グリセロールは、+S9mixで約 $40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、-S9mixで約 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ であった。

このように各々の2物質とも最大遺伝毒性を示すのは、菌体細胞当りの投与分子数が 10^{10} molecules $\cdot\text{cell}^{-1}$ のオーダーにあるときに生じている。

3-5 m-クロロフェノールの遺伝毒性

図2-31にm-クロロフェノールの-S9mix系での結果を示す。 $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.94×10^{10})までは若干増殖阻害を示していたが、 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (2.23×10^{10})投与した際に、投与後、細胞の増殖は停止し、dehydrogenase活性はなくなり基質分解が停止した。この間、umuDC遺伝子の誘発がみられた。投与後28時間後にdehydrogenase活性が復活し、細胞の増殖が再開した。再増殖した菌のOD₅₅₀は、他の投与濃度のケースに比して約2倍の1.6にまで上昇した。このm-クロロフェノールのパターンは先に示したm-ジクロロベンゼン、クロロホルムと類似している。

3-6 化学物質の挙動と細胞のエネルギー

上記で検討した化学物質がどのような機構でDNAに損傷を与えているのか、その事実を示す研究例がいくつか存在する。たとえばホルムアルデヒド、グリオキサールやKBrは活性酸素を生成することでDNAを損傷していることが指摘されている¹⁵⁾。また有機塩素化合物の多くはやはりラジカルを生成することが実証されつつある¹⁶⁾。しかしながらDNA塩基と結合するDNA付加体を生じる損傷が 10^7 塩基対に1つ以上であるのに比し、活性酸素による損傷はそれより生起確率の大きいと考えられているものの、どれくらいの確率で損傷が生起するのか、定量的なデータはほとんど存在していない。

ここでは上記被験物質中、umuDC遺伝子の誘発が、細胞増殖とともに生じたフタル酸のケース、及び物質の投入により細胞増殖が一時停止し、その間umuDC遺伝

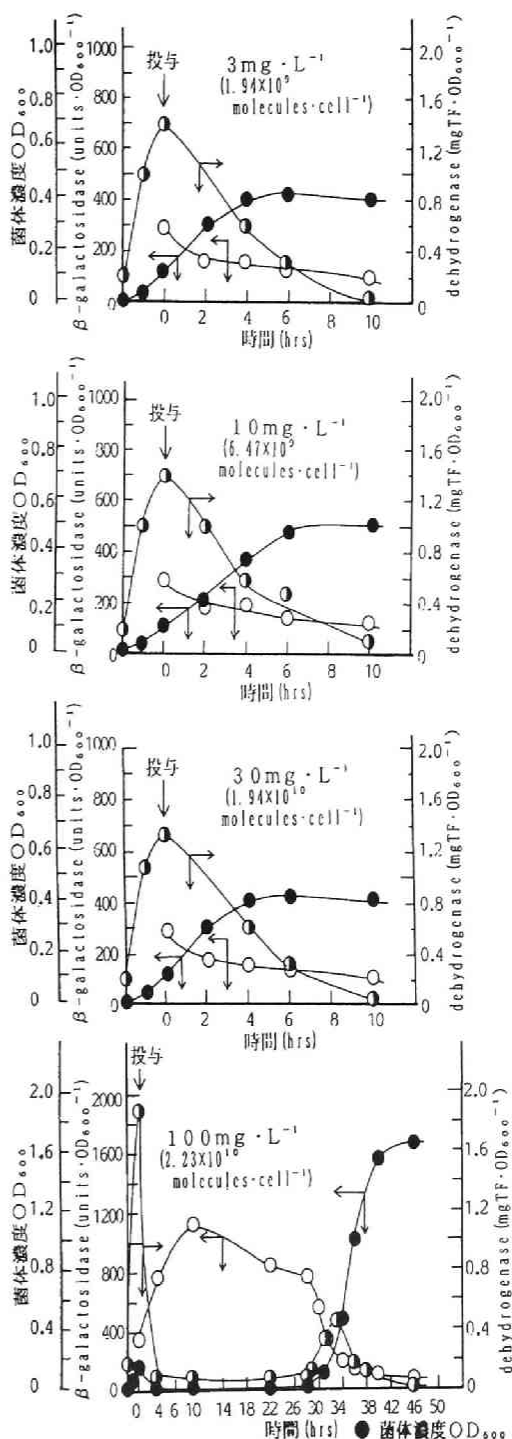


図2-31 SOS修復反応
m-クロロフェノール(-S9mix)

子誘発によるDNA修復が実施されていたと考えられるm-ジクロロベンゼンの場合を取り上げ、投与化学物質の挙動並びに細胞のエネルギーを示すATPの消長を調べた。

プロモホルムは0, 10, 30, 52mg・L⁻¹となるよう菌懸濁液中で調整して与えた。これらの結果を図2-32に示す。図には細胞内外のプロモホルムの挙動も示してある。52mg・L⁻¹の場合には投与2時間から4時間にかけて細胞外のプロモホルムが一部そのままの形で細

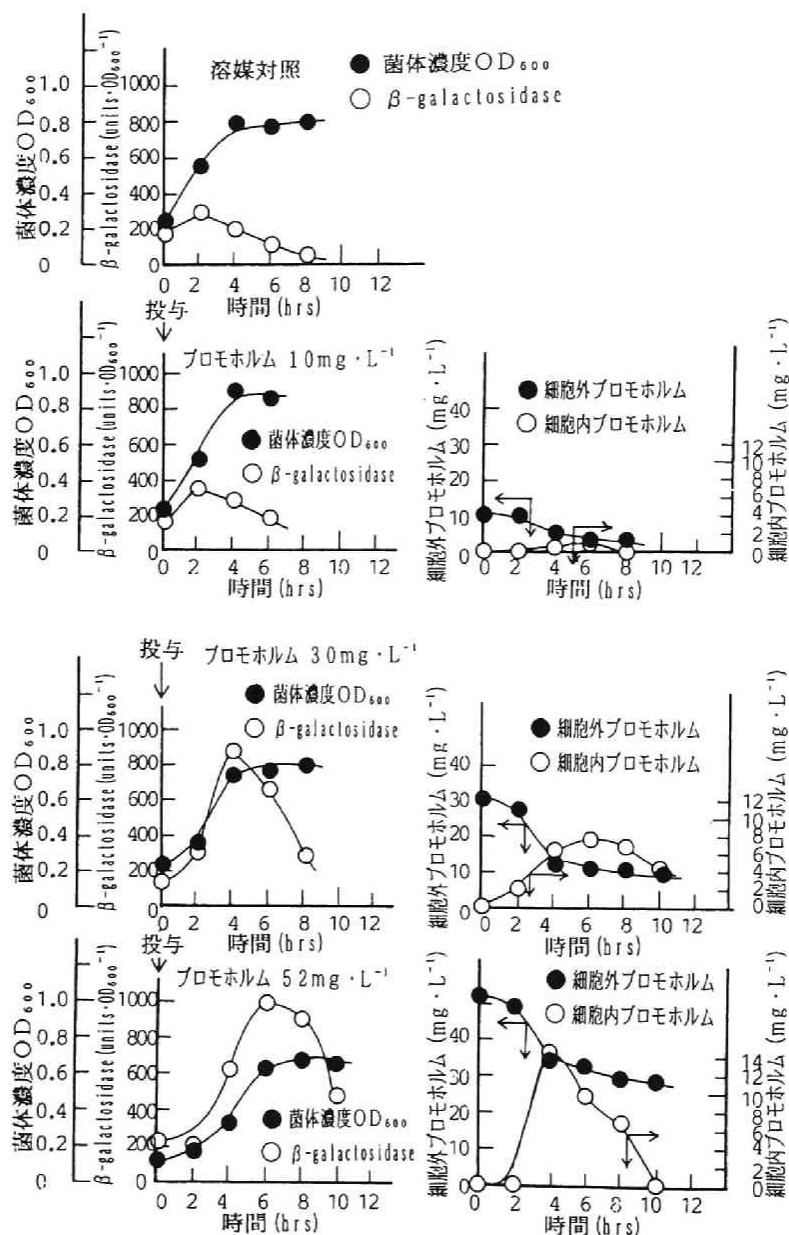


図2-32 プロモホルムの挙動

胞中へ摂取され、細胞内の β -ガラクトシドが最大 $14\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (7.99×10^{10} molecules $\cdot\text{cell}^{-1}$)まで増加している。そして4時間後より徐々に細胞内 β -ガラクトシドは減少した。これは細胞内酵素群により他の化学物質に変換されたことによる減少か、もしくはDNAへの結合による減少とみなされ、この間投与2時間より8時間にかけて β -galactosidase活性にみられるように umuDC 遺伝子のDNA修復が誘導されている。また細胞の増殖はcontrol系に比し、増殖速度は遅く、増殖量も少ない。つまり、 β -ガラクトシドは、それが細胞に摂取されると速やかにDNAを損傷し(DNAに結合したか、もしくは代謝途中で活性酸素を生じる)、それを修復する酵素群が稼働を始めることが考えられる。それは増殖を一時停止するほどの損傷ではないが、細胞のエネルギーは修復に振り向けられ、その分若干増殖阻害が生じると考えられる。

この現象は $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を投与した場合でも観察でき、最大 $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (4.57×10^9)の細胞内 β -ガラクトシドが摂取され、同時にDNA修復機構が働いていることがわかる。また $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ の場合には、 umuDC 遺伝子の誘発はほぼみられず、その点からみれば遺伝毒性は検出できない、つまり陰性の判定がなされるべきだが、実際には細胞内には約 $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (1.14×10^8)

の β -ガラクトシドが摂取され、消費されている。つまりDNAに対して他の濃度列の場合と同様、何等かの反応をしたと考えられるが、この $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ では umuDC 遺伝子が、 lacZ をコードしたこのテスト法では検出できるほど誘発されていないことを示している。このように β -ガラクトシドの場合には、細胞内にその分子が 10^8 molecules $\cdot\text{cell}^{-1}$ 程度細胞内に摂取された場合に umuDC 遺伝子の誘発、すなわち誤りがちのDNA修復の操作が稼働していることがわかった。

図2-33には同様にm-ジクロロベンゼンの0、60、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のケースを示している。細胞外のm-ジクロロベンゼンは、細胞外で他の物質に変換し、細胞内にはm-ジクロロベンゼンとして

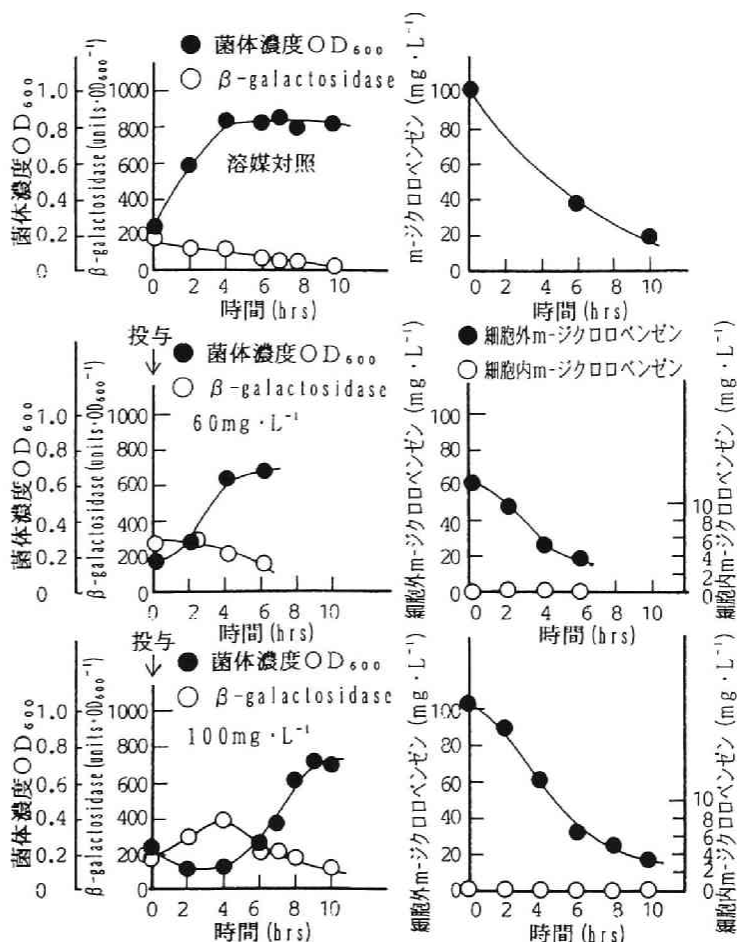


図2-33 m-ジクロロベンゼンの挙動

は存在していない。

これを仮に細胞内2次物質とすれば、 $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のケースにおいて、この2次物質によりDNAは損傷を受け、投与後2～6時間の間にumuDC遺伝子の誘発が観察されている。ただしその間細胞は増殖を一時停止し、修復終了後に再増殖を開始した。

図2-34には、この経時的な試水の採取時の基質の溶解性有機炭素DOCと固形性有機炭素POCを各々の物質に対して表示してある。基質DOCは $0.45\mu\text{mメソプーラ}$ フィルターでろ過した試水をTOC計（島津TOC5000）で測定し、この値から各々の化学物質ブロホルム、m-ジクロロベンゼンの細胞外炭素換算値を差し引いたものである。化学物質の細胞外炭素濃度の基質内濃度に対する割合は、ブロホルムで高々0.025%、m-ジクロロベンゼン

で0.25%と基質量に比し非常に少ない。したがって化学物質そのものが優占的な基質となることは考えられず、細胞は与えたバクトリプトン・グルコース基質で増殖し、化学物質は投与濃度に応じ、増殖阻害や遺伝毒性として働いていると考える。またPOCは、TOC-DOCで計算している。菌懸濁液中の固形物は細菌細胞のみと考えてよく、POCは菌体相当の炭素濃度を表している。これらの図より、収率係数 $\gamma(\text{mgC}\cdot\text{mgC}^{-1})$ を求めると、ブロホルムの場合で0.39～0.53（対数増殖期のみ）、m-ジクロロベンゼンで0.44～0.50（同様）と、本試験菌の γ は、ほぼ0.4～0.5の間にあるといえる。この

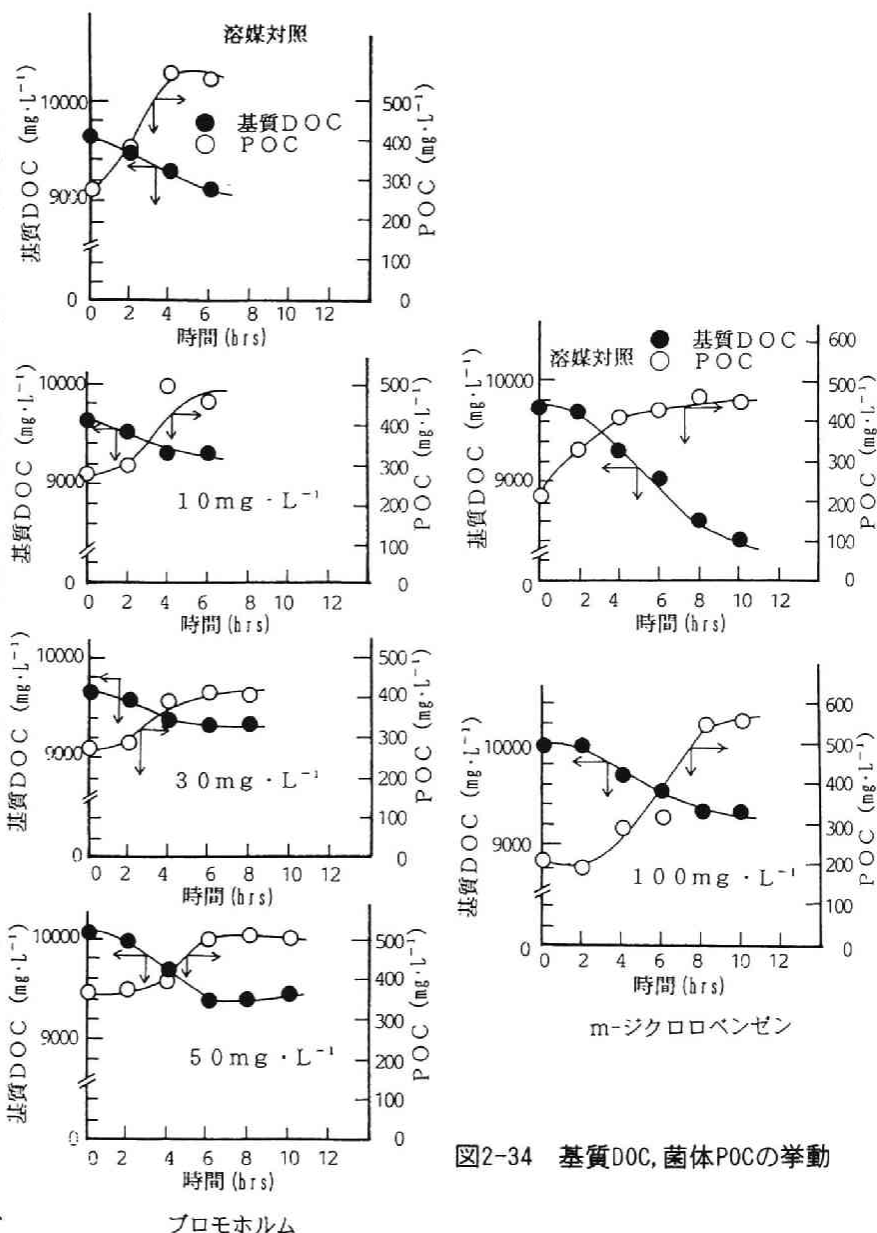
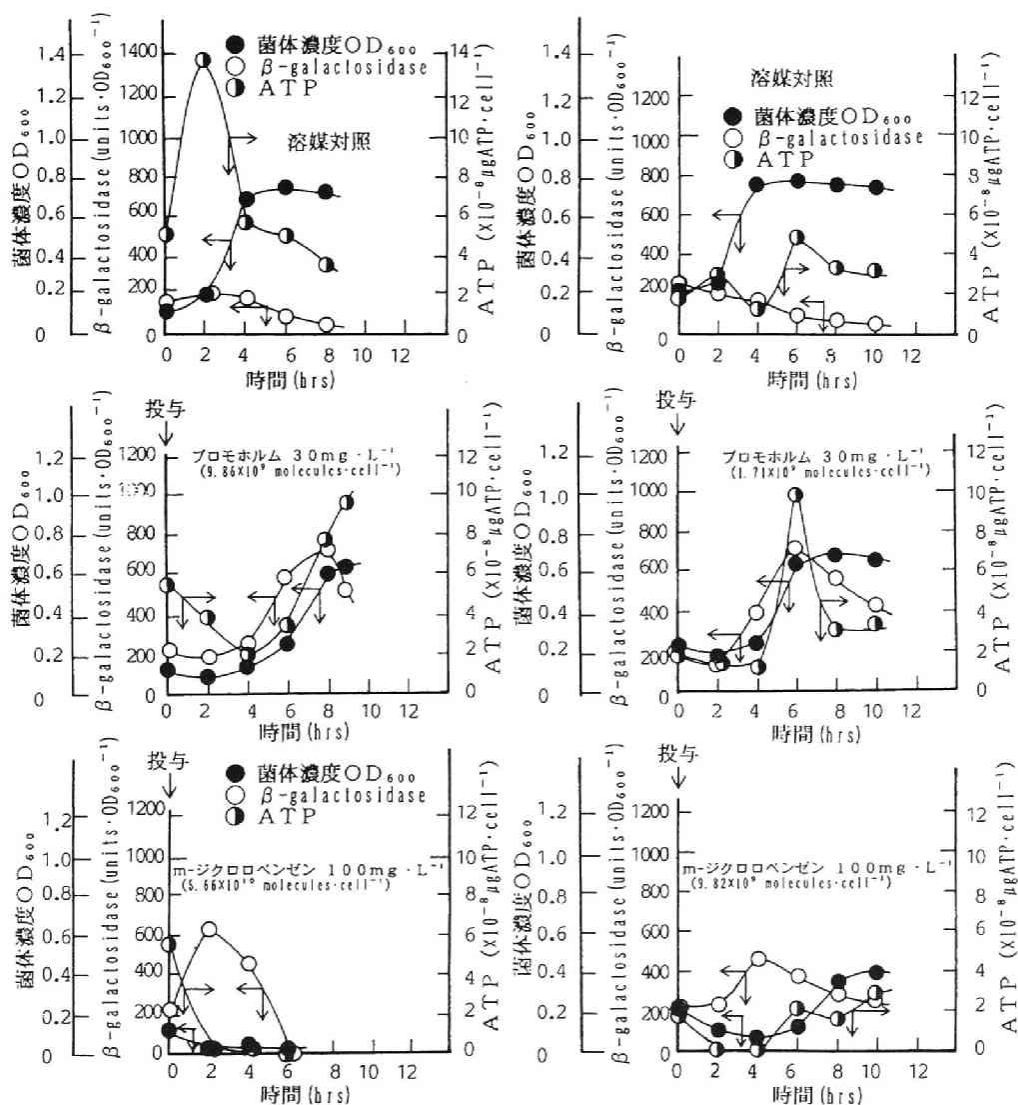


図2-34 基質DOC, 菌体POCの挙動

値は、従来の研究により、単一種の細菌の系で、 COD_{H^+} -sで $0.15 \sim 0.6 (\text{mg COD} \cdot \text{mg C OD}^{-1})$ の範囲にあり、平均して0.5とした例とほぼ一致する値である¹⁷⁾。

このような化学物質を与えたときの細胞の I^{H^+} -、活性を調べるためにATPの誘発を、umuDC遺伝子誘発とともに追跡した。この指標は細胞の活性量を表しているので、ATPが0値を示している状態は、細胞が死滅期にはいつている状態とみなしてよい。これを図2-35に示す。同様の実験をプロモホルム $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、m-ジクロロベンゼン $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ に関して2回実施した。左側の図は初期菌体濃度 OD_{600} が0.16の場合である。細胞は増殖の直前にATPを誘発し、 I^{H^+} -を放出していることがわかる。つまり前項で示したようにdehydrogenaseによる基質分解が始まり、ATPが生産され、これにより細胞の分裂が行われていることを示す。



初期 $OD_{600} = 0.16$

初期 $OD_{600} = 0.21$

図2-35 ATPの挙動

プロモホルム $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($9.86\times 10^9\text{ molecules}\cdot\text{cell}^{-1}$) 投与すると、増殖阻害が約6時間生じているが、この間ATPは減少しており、蓄積されたものが修復のために用いられたと推察され、修復遺伝子の誘発がほぼ最大となる時点で、細胞は増殖のために基質を分解し、ATPを再度蓄積して、細胞の増殖が開始していることがわかる。このことは右側の2回目の実験（初期OD₆₀₀=0.21）でも同様の傾向がみられる。しかしながら、こちらは負荷が $1.79\times 10^9\text{ molecules}\cdot\text{cell}^{-1}$ であり、1回目比して低く、このため増殖阻害された時間は約4時間と短くなっている。

m-ジクロロベンゼンの場合、1回目の実験では $5.66\times 10^{10}\text{ molecules}\cdot\text{cell}^{-1}$ の投与があり、2回目は $9.82\times 10^9\text{ molecules}\cdot\text{cell}^{-1}$ であった。この約6倍の負荷の差は細胞増殖に顕著な差を表した。図より、負荷の高い1回目場合には、細胞は修復が追いつかず、増殖することもなく、OD₆₀₀値は次第に減少していった。ATP値は徐々に小さくなり、ついにルシフェラーゼの蛍光を発するものはなくなった。一方の負荷のやや小さい方は、6時間の増殖阻害のうち、若干誘発したATPが増加を始め、これにともない細胞増殖が始まっている。

このように、細胞の増殖阻害及びこれがDNA損傷によるものなら、umuDC遺伝子の誘発は結局化学物質の細胞当りの投与負荷によるところが大きいことが示され、これにより遅滞期やumuDC遺伝子の誘発量が決ってくることが示唆される。逆にみれば、本試験法による検定の際には、化学物質の投与時の菌体量をコントロールすることがデータの再現性に重要な因子となることがわかる。

またATPにより、増殖阻害つまり静菌状態にある時も、エナジーは誘導されており、それがDNA修復を含む細胞の生命維持に使われているとあってよく、一端細胞が増殖の方向へ向かうとき、先にも示したようにdehydrogenaseによる基質の分解を実施し、これを摂取することによりATPを増産し、細胞分裂していくと考えられる。

3-7 再増殖菌の変異

以上のように化学物質によるストレスを与えられた細菌細胞は、DNA損傷が生じた場合のみ修復遺伝子の誘導により、再増殖を開始することが認められたが、この再増殖した菌が実際に突然変異を生じているかをここでは検討した。umuDC遺伝子の誘発は、先述してきたように突然変異の生起する確率の高い修復量を表している。修復しきれずに細胞死（ATP誘発が止まる）するならば、その細胞は生体より淘汰されるであろうが、変異を起こして生き延びるならば、さらに大きな変異、たとえば染色体異常であるとか、癌細胞へのプロモーションの生起する確率が高くなるといえる。ここではプロモホルム $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と m-ジクロロベンゼン $100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ のケースを例にとり、これら化学物質によるストレスと、それによって生じた突然変異及びumuDC遺伝子の誘発を検討してみた。

図2-36には本実験の概念図を示した。LB培地でovernightの前培養後の試験菌株 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002をTGA培地に植えかえたのち、37℃で振とう培養して、定めた菌体量に増殖したときに化学物質を所定量投与した。この化学物質との反応、すなわちストレスを与えた時間は6時間とした。これは6時間の反応により、ストレスを受けた菌がほぼ再増殖を開始したためである。6時

間の反応後、菌をLB培地に移し、overnight培養後、Amesテストに供した。Amesテストは常法に依った¹⁸⁾。すなわち、前培養（over nightのLB培地）した菌懸濁液を、軟寒天に加え、これをVogel-Bonnerの最小培地とグルコースで調整した7 μ g-プレート上に播種し、37 $^{\circ}$ Cで2晩培養した後、revertant colonyを測定した。overnight培養液は一方で再びTGA培地に移して同様の化学物質の投与を繰り返した。この一連の操作を5回繰り返した。

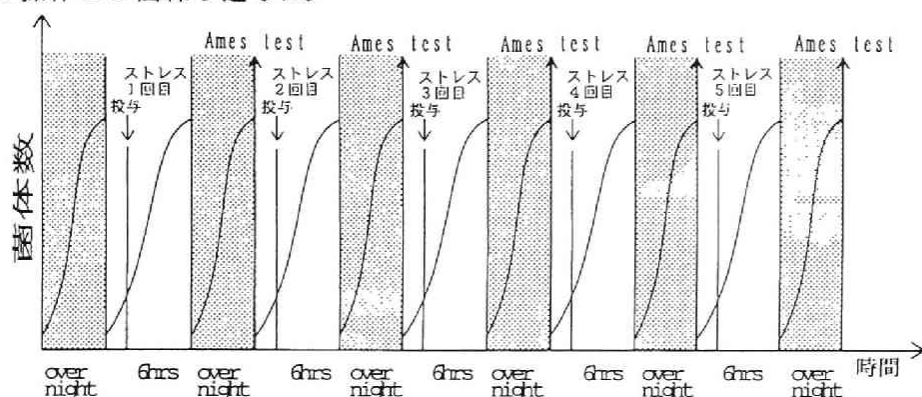


図2-36 化学物質投与実験概念図

図2-37は、このストレスの4回目と5回目時の反応6時間の間に誘発された umuDC 遺伝子を測定している。 p^{HcHLM} の場合は、4回目のストレス時においても、前項までのデータに似たものと同じように umuDC 遺伝子の誘発が4～6時間にかけてみられた。つまり、error-prone repair（誤りがちの修復）は4回続けて実施されていたことになる。

ところが5回目になると、その誘発は全体量が減少したことがわかる。この事実は次のデータと対応している。図2-38に毎回のストレス毎にAmesの培地上の復帰コロニー数より、その突然変異率（TA1538株は塩基対置換型の検出）をみると、ストレスを与える回数が増えるにしたがい、復帰コロニー数は増加し、突然変異率は増えている。この変異は4回目が最大で、5回目ではそれ以上増加していない。つまり5回目の投与時においては、 p^{HcHLM} に対して菌体の変異を繰り返し修復の必要がなくなってしまったと考えられる。同様に m-ジクロロベンゼン についても、図2-37において4回目の投与までは、 umuDC 遺伝子の誘発が盛んに観察できたが、5回目では増加していない。このことは図2-38での4回目までは変異が増え、5回目で停止していることに対応している。

上記のことは、1つには umuDC 遺伝子の誘発は、突然変異を起こす可能性の指標であるものの、これの誘発によって実際にDNAの突然変異が誘導されていることが明かとなった。さらに化学物質のストレスにより再増殖した菌体は、DNA損傷の修復によって増殖を再開するものの、それはSOS反応により変異した株となっていることがわかった。この観点からみれば、ある化学物質の投与によりDNA修復遺伝子（ umuDC 遺伝子）が誘導されることによって、再増殖を示す場合、DNA上に突然変異を有して生存していると考えられる。

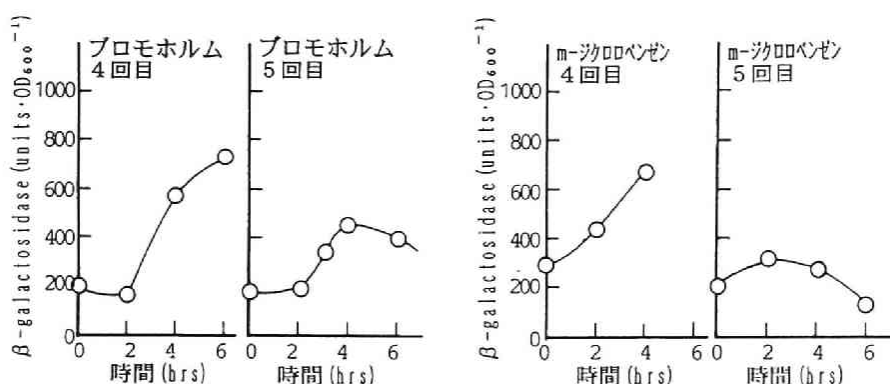


図2-37 ストレスを与えた試験菌のumuDC遺伝子誘発

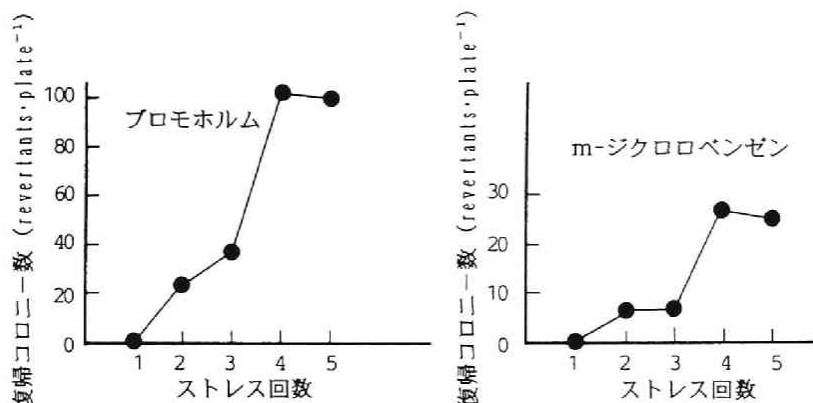


図2-38 Amesテストによるストレスを与えた菌の変異率

3-8 まとめ

化学物質によるSOS修復反応を示すumuテストにおいて、化学物質の種類、濃度により陽性反応の現れ方に差異のあることが観察された。このことは、化学物質の細胞膜透過、細胞質内での拡散、代謝活性化、DNAへの損傷、修復速度、及びDNA上の損傷部位に固有のものがあると推定される。本研究ではDNA修復遺伝子の誘発能を把握することで、化学物質の遺伝毒性の定量表記並びに毒性の比較を試み、umuテスト法の評価を実施し、その測定条件を明確化することを目的とした。得られた知見を以下にまとめる。

- ① DNAの修復がなされているために一時的に細胞分裂を停止することによって観察される細胞の遅滞期の長さは化学物質により異なり、しかもその長さはdose responseを示した。遅滞期の長さは、DNA修復に要する時間を表していると考えられ、これは化学物質の毒性の強さを表記する指標となりうると考えられる。
- ② umuDC遺伝子の誘発量を表す β -galactosidase活性量の経時変化を検討することにより、この誘発速度を算定した。修復遺伝子の誘発速度の大きいことは、DNA損傷箇所の多いこと、さらにumuDC遺伝子により突然変異を誘発する可能性の大きいことを表している。この速度にも物質により差異が認められ、dose responseが示された。
- ③ プロモホルム、m-ジクロロベンゼンを与え、その細胞内外での挙動と、umuDC遺伝子の誘発

を検討した。その結果、プロホルムの場合にはそのままの形で細胞内に摂取され、1 cellに 10^8 molecules程度の量が存在したときにumuDC遺伝子の誘発が観察できた。プロホルムは細胞内酵素により形を変えてDNAを損傷したと考えられる。m-ジクロロベンゼンの場合には細胞外でその形を変えて摂取され、DNAを損傷していることが推察された。

④化学物質が投与され、DNA修復のためにumuDC遺伝子が誘発されている間は蓄積されたATPが修復のために消費され、修復終了時に再度基質分解、ATP蓄積、そして細胞の再増殖がみられることがわかった。

⑤Amesテストによる突然変異試験により、プロホルム、m-ジクロロベンゼンでストレスを与え、umuDC遺伝子の誘発がみられた菌株は、確かにDNA上に塩基対交換の突然変異を生起しているとともに、ストレスを与え続けると、菌株は耐性を有し、変異を有したまま生存することと考えられる。

⑥以上の観点より、本試験法umuテストによる検定上、添加すべき点を以下に列挙し、今後の試験にも採用することとした。

a) umuDC遺伝子の誘発を測定している本法は、誤りがちの修復を知る方法ではあるが、実際にDNA上の変異に係わっている現象をみていると考えてよい。

b) 反応2時間のデータは標準法として他の研究機関のデータと比較するため必要ではあるが、この2時間は投与した化学物質により菌体の増殖阻害が生じなかった系であることを認識すべきであると考ええる。

c) 増殖阻害を生じた系は、overnight incubation後に細胞が死滅期に至ったか(ATPの誘発で知れる)、再増殖したかを確認する。

d) 再増殖した菌体は、遺伝毒性を誘発しているか否かを β -galactosidase活性で確認する。再増殖して遺伝毒性を有した場合は、突然変異をDNA上に有している生細胞とみなせると考えられる。

e) 化学物質投与時の初期菌体数は、細胞の増殖、umuDC誘発の再現性のため、試験を通して統一したほうがよい。

f) 投与化学物質の負荷量表示(投与分子数/単位菌体)は、DNA上の化学物質の作用部位が存在し、それが化学物質により固有のものであるという考え方に符合するため、濃度表示に併記することとする。

第4節 結語

本章では、遺伝毒性試験法であるサモソ菌を使ったumuテストの簡便化、迅速化を検討し、さらに誤りがちのDNA修復をなすumuDC遺伝子の誘発に関する現象より本試験法の有用性を検証し、その適用性を明確にすることを試みた。

得られた成果を以下にまとめる。

①umuテストの簡易化を検討した。主要改訂点は振とう数の増加による前培養時間を短縮化し、細胞膜破砕に界面活性剤SDSを用いることにより、凍結菌体を復水して一晚培養し、翌日の9時に前培養を開始し、酵素活性の測定は午後2時頃には完了できる測定法を提示した。

②試験菌株のOD₆₀₀を生菌数に換算すると対数増殖期において、その吸光度当りでおよそ 6.9×10^8 cells \cdot mL⁻¹ \cdot OD₆₀₀⁻¹程度であった。

③umuテストにおいて、定法では試験菌株との反応時間は2時間であるが化学物質の種類、濃度により陽性反応の現れ方に差異のあることが観察された。塩素処理生成物とされるm-ジクロロベンゼン、クロホルム、ブロホルム、そしてオゾン処理生成物とされるホルムアルデヒド、グリオキサールさらにm-クロロフェノールをモデル物質として、適当な濃度を与え、経時的に菌体濃度、umuDC遺伝子量、dehydrogenase活性量、ATP量などの変化を測定した。この結果、DNAの修復のために一時的に細胞分裂を停止している細胞の遅滞期は、化学物質により異なり、しかもその長さはdose responseを示した。

④umuDC遺伝子の誘発量を表すβ-galactosidase活性量の経時変化を検討することにより、この誘発速度を算定した。この速度にも物質により差異が認められ、dose responseが示された。

⑤ブロホルム、m-ジクロロベンゼンを与え、その細胞内外での挙動と、umuDC遺伝子の誘発を経時的な採取で検討した。その結果、ブロホルムの場合にはそのままの形で細胞内に摂取され、1cellに 10^8 molecules程度の量が摂取されたときにumuDC遺伝子の誘発が観察できた。m-ジクロロベンゼンは細胞外でその形を変えて摂取され、DNAを損傷していることが推察された。

この経時的な変化において、DNA修復のためにumuDC遺伝子が誘発されている間は蓄積されたエネルギー源であるATPがDNA修復のために消費され、修復終了時に再度基質分解、ATP蓄積、そして細胞の再増殖がみられることがわかった。

⑥Amesテストによる突然変異試験により、ブロホルム、m-ジクロロベンゼンでストレスを与え、umuDC遺伝子の誘発がみられた菌株は、確かにDNA上に塩基対交換の突然変異を生起しているとともに、ストレスを与え続けると、菌株は耐性を有し、変異を有したまま生存することと考えられる。この観点から化学物質のストレスを与えて、増殖阻害が起こり、その間umuDC遺伝子が誘発されたのち、再増殖した菌は、突然変異をDNA上に有した菌とみなせる。

⑦本試験法には以下の諸点を添加すべきであると考ええる。

化学物質の投与に際し、再現性のために初期菌体量を試験を通して出来るかぎり一定とすること、つまり化学物質の試験菌株に対する負荷量は統一すること。

反応2時間の標準データは測定する必要があるが、増殖阻害がみられた場合、反応をovernightで実施する系を作り、細胞が死に至ったのか、あるいは再増殖したのかを確認する必要がある。再増殖した場合には、遺伝毒性的にはより危険な化学物質であると推察できる。また化学物質の投与量は負荷量表示とし、濃度表示に併記することが望ましい。

引用文献

- 1) 田島弥太郎編(1980);環境変異原実験法、講談社
- 2) 武部啓(1980);DNA修復、東大出版会、20-57
- 3) 品川日出夫(1990);変異原物質によるDNA傷害：修復と突然変異、環境変異原研究、12(3)、265-274

- 4) 中村桂子、松原謙一監訳(1985); 細胞の分子生物学(上)、教育社、p214
- 5) 加藤武司(1986); SOS変異原性の機構、環境変異原研究、8(2)、13-18
- 6) Oda Y. et. al. (1985); Evaluation of the New System(umu-test) for the Detection of Environmental Mutagens and Carcinogens, Mutation Research, 147, 219-229.
- 7) 小田美光(1991); UMU遺伝子の発現を利用した環境変異原物質の短期検出法とその応用に関する研究、大阪府立大学学位論文
- 8) Miller J.H. (1972); Experiments in Molecular Genetics, 352-355, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 9) 品川日出夫、中村清一、中田篤男、加藤武司、小田美光(1985); umuテストによる環境変異原の検出法、トキシコロジーフォーラム、8、580-586.
- 10) 山田文夫他編(1987); バイオテクノロジー実験マニュアル、p250、三共出版
- 11) 中村清一(1988); 変異原物質の短期試験法の開発、科学と工業、62(4)、142-148.
- 12) 小田美光、中村清一、沖岩四郎、中田篤男、品川日出夫(1984); umu-lac融合遺伝子を利用した環境変異原の短期検出法(umu-test)について、環境変異原研究、6、87-92.
- 13) 下水試験方法(1986); 日本下水道協会、292-293
- 14) 吐山豊秋(1986); 化学物質の発癌性危険率評価の理論的背景、水質汚濁研究、9(9)、544-554
- 15) 祖父尼俊雄、石館基(1988); 変異原性と活性酸素、活性酸素、共立出版、178-185
- 16) 井上圭三ら(1991); 環境汚染物質としての有機塩素化合物の毒性発現メカニズムとその複合要因、文部省重点領域研究「人間環境系」研究報告集、環境要因の人体影響(4)、51-62
- 17) 藤井滋穂(1989); 富栄養化水域の自浄作用に関する研究、京都大学学位論文、51-52
- 18) 古川勇次(1987); 微生物を用いる突然変異テスト、バイオテクノロジー実験マニュアル、三共出版、241-247
- 19) 小野芳朗、宗宮功ら(1988); umuテストによる環境変異原検出法の検討、第22回水質汚濁学会講演集、233-234
- 20) Ono, Y., Somiya, I., et. al. (1991); The evaluation of genotoxicity using DNA repairing test for chemicals produced in chlorination and ozonation processes, Water Science & Technology, 23, 329-338

第3章 化学酸化処理生成物の遺伝毒性

第1節 概論

塩素消毒は、水が飲料水として使用されていく過程で普及した消毒法である。それは文政年間以降、海外からもたらされた消化器系伝染病（コレラ、チフス、赤痢など）に対する社会的な予防装置として水中微生物消毒のための役割を担ってきた。

ところが1970年代以降、フミン酸を前駆物質とする各種有機塩素化合物の生成と、それらのうちクロロムが発癌性を示すことが明らかになると、必ずしも安全な水が供給されているとは確信されなくなった。一方、水道水源の汚染の進行は、藍藻類によるかび臭の発生をとめない、臭気を制御する方法として高度処理の適用が進められつつある。高度処理の一つにオゾンによる酸化力を利用し、水中の微量有機物の分解及び微生物の殺菌を図るものがある。

オゾンの適用範囲は、欧州大陸においては古くより飲料水の消毒剤として用いられてきているが、わが国でも浄水設備の他、下水の再利用水を使つての親水空間や、各地でのスポーツ施設のプール、水族館に普及しつつある¹⁾。このオゾン酸化の普及には、水道の安全性に市民が疑念を有し始めたことに加え、より品質のよい水を求める声が背景として存在している。それに答えるべき技術としてのオゾン処理は、酸化力が高く、水中有機物を親水化でき、水の透明度を高め、塩素のような刺激臭のない、比較的まろやかな味覚を提供できる水を生産しうる。

塩素消毒による副生成物の変異原性に関しては、多くの研究者が塩素処理水の濃縮試料を、バイオアッセイに適用して調べている。Lopper²⁾は、塩素処理工程のXAD樹脂濃縮物をAmesテストにかけ、TA100株で陽性を示したとする。Vartianen³⁾は、東フィンランドの塩素消毒を施した飲料水をXAD4、XAD8樹脂で吸着、pH2の画分についてAmes/*Salmonella*系で陽性を検出している。亀井⁴⁾は、泥炭池着色水の塩素処理水をXADで吸着、ジクロロメタンとメタノール画分に強い変異原性（Amesテスト）をみいだしている。Monarca⁵⁾は、XAD2に比較してSep-pak（ミルコア社、Waters Div.）樹脂を使い、5倍も高い濃度の有機物を吸着している。この抽出物はAmesテストの-S9mix系で陽性を示している。この変異原性は、THM、TOXの濃度に相関があることを示した。またMeier⁶⁾も同様に、塩素処理水中、変異原性は不揮発性化学物質であるとし、それらがTOXと関係していることを明らかにしている。

このように塩素処理生成物と、その濃縮法、変異原性画分に差異があるのは、その副生成物の前駆体によるものであると考えられる。前駆体としてFielding⁷⁾は、リグニン、水溶性フミン酸、アミノ酸（メチオン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、プロリン）をあげている。これらを塩素処理することにより生ずる変異原性の同定物質には、プロモホルム、トリクロロメチル、テトラクロロメチル、クロラールそしてMX（3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone）などを示した。このMXは近年発見された塩素処理水中の強力な変異原性物質で、Kronberg⁸⁾によれば、その変異原性寄与率は塩素処理をしたフミン酸水中の50～100%、飲料水抽出物の20～50%であるとしている。とくに木材の漂白過程で多く発見されており、Holmbom⁹⁾は、カナダの

木材破砕工場の漂白過程で、MXがAmesのTA100株で陽性を示したと報告している。ただし、MXはpH2で安定、pH6.5で水溶性が増して開裂し、pH12で消滅する。

この塩素消毒の代替法としてのオゾン処理も、その副生成物、とくにカルボニル化合物を中心として変異原性物質の生成することが知られている。山田¹⁰⁾は、下水のろ過水を使用し、オゾン処理により、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピョナルデヒド、フルワール、グリオキサール、メチルグリオキサール等が生成することを同定した。このうちホルムアルデヒドとグリオキサールが変異原性を有することが知られている。

このような塩素処理により発生するトリハロメタン(THM)を中心とする有機塩素化合物生成抑制のため、オゾン処理導入が考案された。Rice¹¹⁾は、オゾン処理を塩素処理の前に導入することで、THM生成の前駆体がオゾンにより分解し、結果的にTHM生成を抑制することを示している。Dolarら¹²⁾は、塩素処理によって誘発された変異原性は、オゾン処理により減少しうること示した。亀井ら⁴⁾は、同じ水塊に対し、塩素処理とオゾン処理の変異原性生成比較を行い、オゾン処理による濃縮物の変異原性が塩素処理のそれに比し、はるかに小さいことを示している。Huckら¹³⁾は、パイロットプラント実験で塩素、オゾン処理を比較し、Amesテストにおいて塩素処理水はTA98、TA100両株ともに陽性であるのに比し、オゾン処理はほとんど検出しないことを示している。Cognetら¹⁴⁾は、フランスの河川水で高濃度有機物の存在する場合には、塩素、オゾン処理ともに変異原性物質を生じ、その差異は明らかでないが、オゾン-活性炭処理で変異原性は減少することを示した。Koolはオゾン-活性炭処理で1年以上にわたって変異原性活性(Ames法)を検知レベル以下に減じることができたと報じ¹⁵⁾、塩素、二酸化塩素、オゾン処理の比較で塩素は非常に強い変異原性(Ames法)を示すこと、二酸化塩素は5~15mgClO₂・L⁻¹の濃度で強い変異原性を示すが、5mgClO₂・L⁻¹では示さないこと、オゾンは3mgO₃・L⁻¹でわずかに変異原性を示したが10mgO₃・L⁻¹で完全に消失することを示している¹⁶⁾。Hartemann¹⁷⁾は、哺乳動物細胞V79 HGPRT cellを用いた変異原性試験で、オゾン処理が塩素処理の代替で変異原性を減少させ、活性炭を用いるとさらに効果が上がることを報告している。Bourbigotら¹⁸⁾は、同様にV79細胞とSOS遺伝子誘発を応用したSOS chromo testで、少量のオゾン処理では変異原性が高く検出されるが、より多くすると変異原性が消えること、活性炭を通せば、完全に消失すること、オゾン処理が生物分解性を増す効果があり、砂ろ過で16.5%の分解性が、オゾン+砂ろ過で24.5%に上昇すること、ひいては塩素消費量が減少し、有機塩素化合物の生成が減少する効果のあることを示した。

このように塩素処理で生じる有機塩素化合物が強い変異原性を有し、かつそれらが難分解性物質で水中に残存するものであるのに比し、オゾン処理は確かに副生成物に変異原性を有するものも存在するが、それはオゾン処理の程度によること、十分な処理により変異原性を消失しうること、またオゾン酸化が生物分解性を高め、たとえ副生成物を生じて、水中にて分解し易いこと、それ故、活性炭併用で、その生物ろ過効果を期待することにより、容易に分解できること、最終的に塩素消毒を施しても、有機塩素化合物の生成は少ないことなど、代替消毒法としての利点が数えられる。

本章では、塩素処理、オゾン処理で生成される有機物群に対し、その遺伝毒性

を定量的に評価するため、一次スクリーニングとして細菌細胞ではumuテストを、さらに二次スクリーニングとして哺乳動物細胞を用いた染色体異常試験を実施した。

第2節 umuテストによる遺伝毒性

2-1 概説

塩素消毒においては、とくに生成物中のトリハロメタンを中心とする有機塩素化合物の変異原性、発癌性が指摘されてきている。一方、塩素消毒に代替する技術として普及しつつあるオゾン酸化処理に関しても、その副生成物の安全性の評価が定量的になされる必要がある。ところで先にも示した通り、主として疎水性の有機塩素化合物と親水性のアルデヒド類などのオゾン処理副生成物は、濃縮する方法も異なり、その方法によって回収される変異原物質も選択される。両化学酸化法を変異原性の観点から比較するときには、単純に酸化処理水をそろえて同じ濃縮を施しても正確な比較をしているとはいえない。

そこで本節では、塩素処理工程、あるいはオゾン処理工程において生成されると同定された代表的な化学物質に関して、第2章中で示したumuテストを適用し、両酸化法の副生成物の遺伝毒性の評価をした。

2-2 実験方法

本節におけるumuテストでは、第2章第1節で検討した方法論により、凍結保存した試験菌株を完全培地中で一晩で復活させ、これをTGA培地で希釈、前培養後、被験化学物質と2時間反応させた。また試験対象とする化学物質により試験菌株の陽性反応を呈するまでの反応時間は異なることが前章中でも示したように予想される。そこで本節では開発された常法による化学物質との反応時間2時間の他、化学物質を長時間試験菌体と反応させて陽性反応を判定することとした。

本節で扱った被験化学物質は、塩素処理あるいはオゾン処理によって生じると想定されている有機物質で、各々18および19物質を選択した^{18) 19)}。それらの物質を表3-1に示す。これらの物質を適当な溶媒(水、エタノール、DMSO)に溶解し、10倍希釈で約5段階の希釈列を作った。

被験化学物質の中には揮発性を有するものもあるので、これらについては50mLバial瓶に菌懸濁液と化学物質をいれ、密栓し、反応のために振とう培養した。

陽性の判定は以下に示す方法によった。反応2時間の間に菌のDNA中での自然発生的に生じる損傷を考慮し、被験化学物質のある検体量における反応2時間後の酵素活性量Aから、溶媒対照における同2時間後の酵素活性量Bを差し引いた上で、溶媒対照の酵素活性量Bで除し、この遺伝毒性強度(A-B)/Bが2以上を強陽性、1から2を陽性、1以下を陰性と判定することとした。

長時間処理の実験は、TGA培地中で増殖した菌懸濁液を100mL培養フラスコに分注し、これに被験化学物質を所定濃度になるよう投与した。同時に必要に応じてS9mix溶液を添加した。培養フラスコを145rpm、37℃で振とうし、2時間毎に5.4mLを採取し、菌体濃度OD₆₀₀と、β-galactosidase活性を測定した。同時に溶媒対照

も測定し、上記と同様の判定基準で被験物質の遺伝毒性を評価した。

被験物質は、表3-1の化学物質中、反応2時間のumuテストの結果を勘案して以下のものを選択した。

m-ジクロロベンゼン,
1, 2, 4-トリクロロベンゼン,
ブロモホルム,
クロロホルム,
トリクロロエチレン,
テトラクロロエチレン

アセチルアセトン,
グリオキサール,
イオン,
アクロレイン

表3-1 使用化学物質

化学物質	入手先
クロロベンゼン 1, 2, 4-トリクロロベンゼン テトラクロロエチレン ジクロロメタン 1, 1, 1-トリクロロエタン 1, 1, 2-トリクロロエタン 1, 2-ジクロロプロパン 1, 4-ジクロロブタン トリクロロエチレン 1, 2-ジクロロエタン 四塩化炭素 クロロホルム クロロ酢酸 ジクロロ酢酸 トリクロロ酢酸 クロラール ホルムアルデヒド アセトアルデヒド ブクロンアルデヒド アセチルアセトン カルボニル グリオキサール ベンズアルデヒド イオン イソプロピルメチルケトン イソプロピルアルコール ヘキサール アセトフェノン アンスタキノン ハイドロキノン シュウ酸	和光純薬工業株式会社 (大阪)
m-ジクロロベンゼン p-ジクロロベンゼン ブロモホルム	ナカテック (京都)
フルフラノ アクロレイン n-吉草酸アルデヒド	東京化成 (東京)

2-3 反応時間2時間に対する判定
被験化学物質の濃度
効果の例を 図3-1に示した。図は上段が各希釈濃度列に対する菌体濃度をOD₆₀₀で、下段は

反応2時間で呈したβ-galactosidase活性を示してある。図3-1(1)は典型的な強変異原物質として知られるAF-2のdose responseを示したものである。AF-2に対するumuDC遺伝子の誘発、すなわちβ-galactosidase活性は $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 0.00001^{-1}$ ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) で最大に達するが、それ以上の薬品を投与すると、2時間の反応時間内ではDNA修復ができず、細胞は増殖してこないことがわかる。

同様に 表3-1 中に示した被験化学物質に対して行った結果、10⁶の希釈列に対して得られたdose responseの例を図3-1(2)～(7)に示した。いずれも化学物質と菌懸濁液との反応時間は2時間であり、各物質である濃度以上になると、umuDC遺伝子の誘発(β-galactosidase活性の増加)が観察できる。ここで各化学物質の濃

度が比較的高くなると OD_{600} が減じ、菌の生存率が減じているような結果にみられる。一般にAmes法においては、菌の生存率が50%以下となるようなデータについては、killingの判定をなすことが多い。ところで本法においては、液体培地中で菌体が化学物質と反応して2時間後に増殖がみられなかったことは、前章で示したように、いわゆる静菌作用によって増殖が阻害され、2時間の反応時間内では増殖しなかったことを表していると考えられる。このことが化学物質による溶菌作用ならば、再び増殖することはあり得ないが、DNAの損傷による増殖阻害ならば、修復機構は働いていると考えられ、umuDC遺伝子の誘発は、この間も続いていると考えられる。その意味でunits・ OD_{600}^{-1} はumuDC遺伝子の誘発と、細胞増殖双方を示す単位といえる。細胞死と判定できるケースは図3-1(6)(7)の+S9mixのように、 OD_{600} も β -galactosidase活性も減じた場合と考えられる。

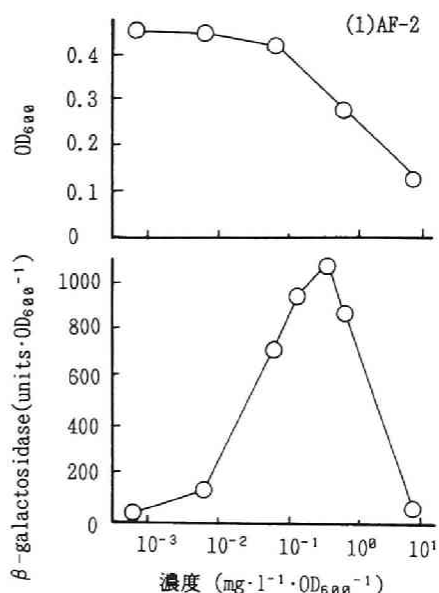


図3-1(1) 濃度効果 AF-2

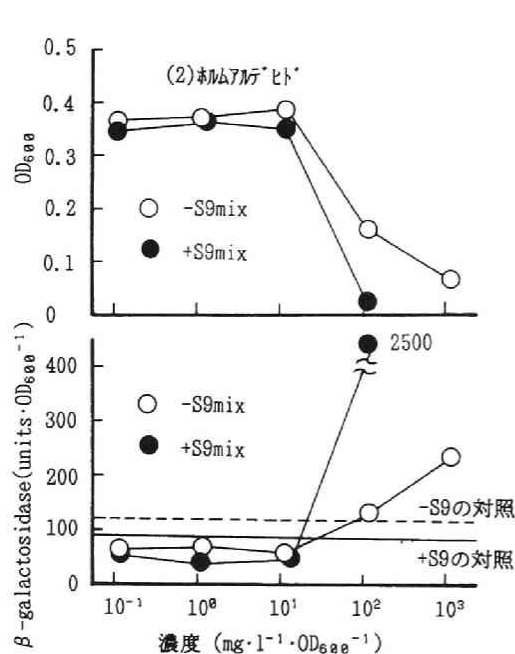


図3-1(2) 濃度効果 アフラトキシンB1

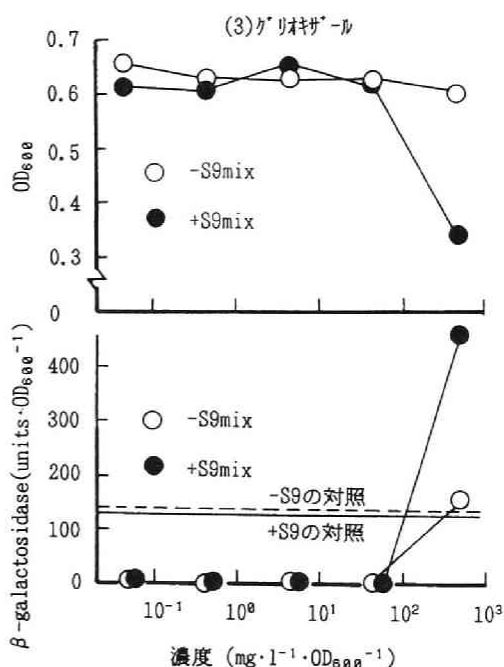


図3-1(3) 濃度効果 グリキザール

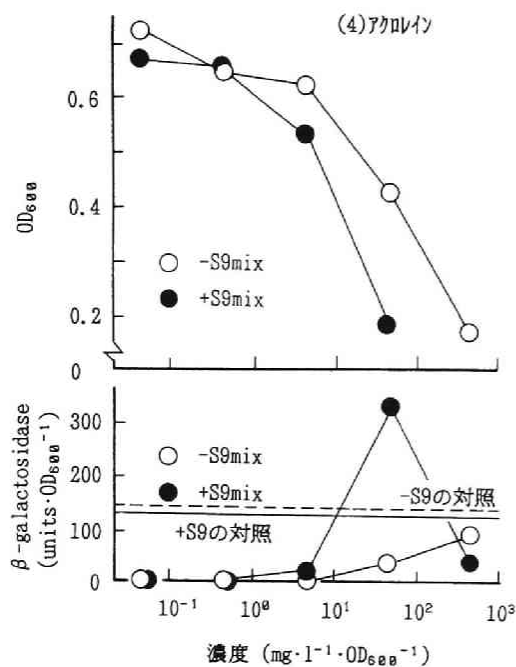


図3-1 (4) 濃度効果 アクロレイン

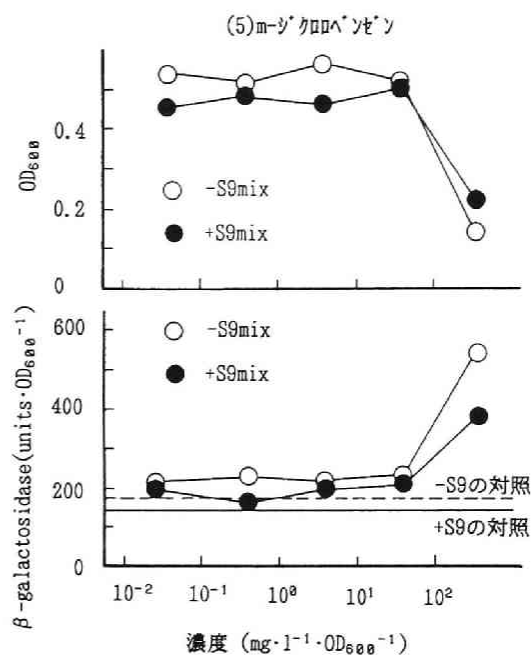


図3-1 (5) 濃度効果 m-ジクロロベンゼン

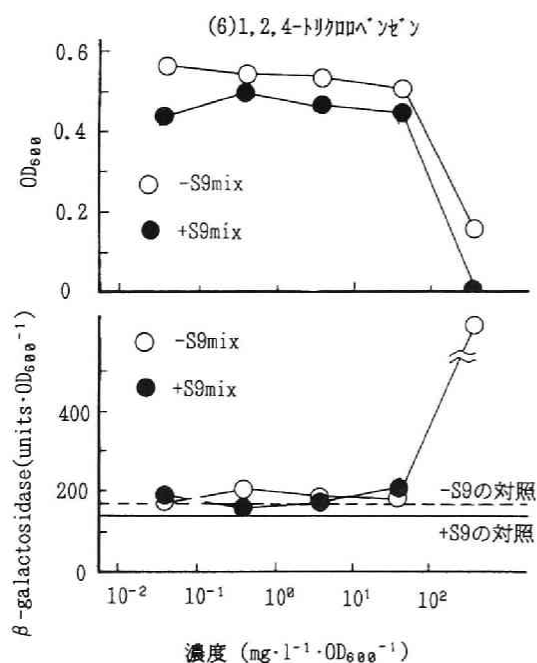


図3-1 (6) 濃度効果 1,2,4-トリクロロベンゼン

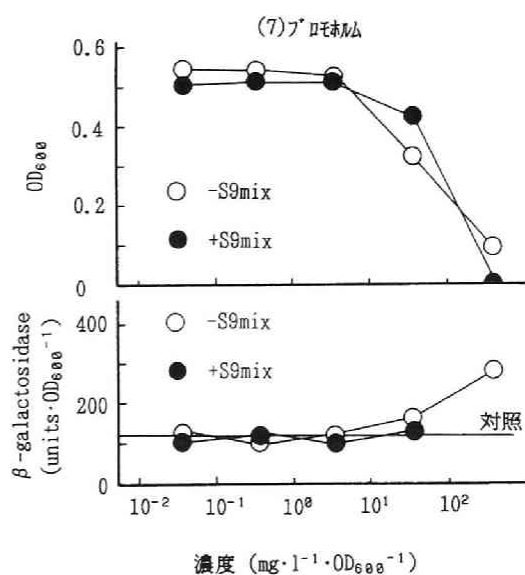


図3-1 (7) 濃度効果 プロモホルム

表3-2に、塩素処理による副生成物として知られる化学物質に対してumuテストを適用した結果のうち、反応時間2時間の成果を示した。表中、化学物質の濃度は反応させた菌懸濁液中における各化学物質の濃度を反応初期菌体濃度を示す吸光濃度0.000で除してある。また表中、umu test欄の数値は判定基準(A-B)/Bを示したものである。さらにAmesテストの結果^{20) 21) 22)}と、Rec-assay法によるDNA損傷試験の結果²³⁾を併記してある。

表3-2 塩素処理副生成物の遺伝毒性(反応2時間)

化学物質	濃度 ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot 0.000^{-1}$) ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)		umu test(A-B)/B		Ames test	Rec-as.	
			S9-	S9+		S9-	S9+
クロロベンゼン	442.5	100	0.45	0.67 -	-		
m-ジクロロベンゼン	442.5	100	2.06 ++	1.60 +	-		
p-ジクロロベンゼン	442.5	100	0.02	0.16 -	-(Z)		
1,2,4-トリクロロベンゼン	442.5	100	7.00 ++	k	-	-	++
テトラクロロエチレン	442.5	100	0.10	0.13	+	+	+
ジクロロメタン	442.5	100	0 -	0.48	+		
1,1,1-トリクロロエタン	476.2	100	0.76 -	0.21	+		
1,1,2-トリクロロエタン	476.2	100	0.08 -	0			
1,2-ジクロロプロパン	476.2	100	0 -	0.07	+		
1,4-ジクロロベンゼン	476.2	100	0 -	0 -	?		
ブロモホルム	476.2	100	1.30 +	- k	+		++
トリクロロエチレン	476.2	100	0.36	0.06 -	+		-
1,2-ジクロロエタン	393.7	100	0	0.18 -	+		
四塩化炭素	393.7	100	0.46	0.30 -	+(M)	++	r
クロホルム	393.7	100	0.22	0 -	+	-	++
クロ酢酸	485.4	100	0.08 -	0.34 -			
ジクロロ酢酸	58.5	10	0.47 -	1.50 +	-		
トリクロロ酢酸	58.5	10	0.72 -	1.18 +	+		
クロラール	58.5	10	0.81 -	1.30 +	+		

濃度は陽性を示した最小値

S9-; 代謝活性 無

S9+; 代謝活性 有

k; 細胞死

r; 逆転

++; 強陽性

++; 陽性

-; 陰性

Ames test (Z); Zeiger 21)

(M); MacCann et al. 22)

others; RTECS 20)

Rec-assay; Matsui et al. 23)

同表より、umuテストにより変異原性陽性を呈する化学物質は、代謝活性なし(-S9mix)で①m-ジクロロベンゼン((A-B)/B=2.06), ②1,2,4-トリクロロベンゼン(7.00), ③ブロモホルム(1.30)であった。また代謝活性あり(+S9mix)の場合、陽性を示したものは、①m-ジクロロベンゼン(1.60), ②ジクロロ酢酸(1.50), ③トリクロロ酢酸(1.18), ④クロラール(1.30)であった。このうち、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸は比較的低い濃度($58.5 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot 0.000^{-1}$ ($10 \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$))で陽性を示した。また、+S9mixで1,2,4-トリクロロベンゼンとブロモホルムは、表示した濃度においては、反応2時間内にて菌体の増加及び β -galactosidase活性の増加も観察できず、前記のような化学的ストレスとは異なり、いわゆる

細胞死(killing)と判定してある。

以下の物質はS9mixの投与により本試験において(A-B)/B値を増した。

クロロベンゼン; p-ジクロロベンゼン; ジクロメタノ;

1,2-ジクロロエタノ; クロ酢酸; ジクロ酢酸; トリクロ酢酸; クロラール

また、1,2,4-トリクロロベンゼンとプロモホルムはS9mixの投与によって毒性が増し、この反応2時間以内での細胞死が観察された。

さらにumuテストの結果をAmes法並びにRec-assayの結果と比較した。umuテストで2時間の反応で陰性と判定された物質のうち、テトラクロロエチレン、ジクロメタノ、1,1,1-トリクロロエタノ、1,2-ジクロロプロパン、トリクロロエチレン、1,2-ジクロロエタノ、クロホルムは、Ames法では陽性と判定されている。このことは、Ames法は化学物質を投与し、mutationをおこして増殖コロニーを検出するまで、判定に48時間要しているのに対し、umuテストでは2時間での結果をみていることから、反応時間の差に起因している可能性が考えられる。したがって、ここで試験した19種の有機塩素化合物に対しては、反応時間を長くとることにより、陽性反応を示す物質も存在することが予想される。一方のRec-assayとumuテストの関係は、Rec-assayがrecA遺伝子の有無によるDNA損傷試験であるのに対し、umuテストはDNA損傷時の最初の誘発がrecA遺伝子の発現、および続いて起こるumuDC遺伝子をlacZにより直接測定している。これら反応機構の点から、両法の関連は大きいように思われるが、試験菌の増殖までを考えると、両法の結果を連続したSOS反応の原理の中で捉えきれないことも事実であることが観察された。表中での有機塩素化合物ではRec-assayで陽性と判定され、umuテストで陰性であった物質にはテトラクロロエチレン、四塩化炭素、クロホルムがあるが、recAの発現により、その後細胞が死んだのか、あるいは変異したのかはDNA損傷試験ではわからず、少なくとも2時間内ではumuDC遺伝子の発現はみられなかったということになる。

表3-3には同様にオゾン処理によって生成されるとされる化学物質について、umuテストの結果を示した。

-S9mixで陽性を示したものは、①ホルムアルデヒド²⁰⁾ ((A-B)/B=1.46)、②イオノ(5.37)であった。また+S9mixで反応した化学物質は、①ホルムアルデヒド(38.8)、②フルワール(1.02)、③カルボソ(2.21)、④グリオキサール(2.50)、⑤アクリン(1.80)であった。このうち比較的低濃度で陽性を呈した物質はホルムアルデヒド($123.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 0.0666^{-1}$ ($10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$))とアクリン($49.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 0.0666^{-1}$ ($10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$))である。

S9mixの投与でおおむねの物質は(A-B)/B値を増加させている。またイオノはS9mixの投与で反応時間2時間では細胞死と判定した。

以上の結果をAmesテスト²⁰⁾と比較してみると、18種のカルボニル化合物に関しては、2/3が一致した判定結果を示している。

これらの事実より、対象とした化学酸化副生成物物質群により各アッセイの原理上判定結果の一致に差異を生じることが示唆され、umuテストにおいては次項に示すように反応時間について検討を試みることにする。

表3-3 オゾン処理副生成物の遺伝毒性（反応2時間）

化学物質	濃度		umu test(A-B)/B		Ames test	Rec-as.			
	(mg・l ⁻¹ ・OD ₆₀₀ ⁻¹)	(mg・l ⁻¹)	S9-	S9+		S9-	S9+		
ホルムアルデヒド*	123.5	10	1.46	+	38.8	++	+	++	++
アセトアルデヒド*	1234.6	100	0.25	-	0.95	-	+	-	+
プロピオンアルデヒド*	1234.6	100	0.25	-	0.93	-	-	-	r
フルアルール	1234.6	100	0.22	-	1.02	+	+	r	-
アセチルアセトン	1234.6	100	0.57	-	0.95	-	-	-	+
カルボニル	1234.6	100	0.29	-	2.21	++	-	-	-
グリオキサール	492.6	100	0.98	-	2.50	++	+	++	++
アクロレイン	49.3	10	0.17	-	1.80	+	+	++	-
ヘンズアルデヒド*	492.6	100	0.11	-	0.27	-	+	-	+
イオン	492.6	100	5.73	++	k	-	r	r	r
n-吉草酸アルデヒド*	492.6	100	0.28	-	0.51	-	-	-	-
イソプロピルメチルケトン	492.6	100	0.13	-	0.25	-	-	-	-
イソプロ	680.3	100	0.55	-	0.46	-	-	+	r
ヘキサール	680.3	100	0.46	-	0.65	-	-	-	-
アセトフェノン	680.3	100	0.22	-	0.33	-	-	-	-
アノスラキノ	680.3	100	0	-	0.04	-	+	-	-
ハイドロキノ	680.3	100	0	-	0.07	-	+	-	-
シュウ酸	719.4	100	0.01	-	0.14	-	-	-	-

濃度は陽性を示した最小値

S9- ; 代謝活性 無

S9+ ; 代謝活性 有

k ; 細胞死

r ; 逆転

++ ; 強陽性

+ ; 陽性

- ; 陰性

Ames test ; RTECS 20)

Rec-assay ; Matsui et al. 23)

2-4 反応時間を長時間とした場合の判定

細胞の化学物質による増殖阻害では、化学物質のタンパク質などの細胞成分との反応、DNAとの結合、細胞膜との反応等が原因とされ、細胞が増殖を抑制される静菌作用が観察されることがある²⁴⁾。また化学物質の構造や、物理化学的性状が生物への毒性に関連することは、たとえば化学物質の疎水性が分子の生体膜透過性評価上の主要なパラメータとなることなどが指摘されている²⁵⁾。このように開発された常法による被験化学物質との反応時間は2時間とされているものの、物質によっては、細胞膜の透過や、細胞質内拡散、DNA塩基との反応に時間を要するものも存在することを想定される。実際、本法の開発者である小田らもhydrogen peroxideやglutaraldehydeなどの物質については反応5時間の中でumuDC遺伝子の誘発を検討している²⁶⁾。また前章第3節で示したように、化学物質により増殖と、修復遺伝子の誘導には差異のあることを確認している。そこで前項で示した表3-2 及び 表3-3 の結果から、短時間処理ばかりでなく、試験菌株と化学物質を2~24時間反応させ、菌の β -galactosidase (umuDC遺伝子)の誘導を観察した。結果を表3-4 に示した。

表中には被験物質を試験菌懸濁液に与えたときの濃度 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$ (() 中

表3-4 反応を長時間とした場合の遺伝毒性

化学物質	濃度 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{OD}_{550}^{-1}$ ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	S9-	反応時間 (hrs.)	濃度 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{OD}_{550}^{-1}$ ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	S9+	反応時間 (hrs.)	Ames	Rec-as. S9- S9+
m-ジクロロベンゼン	196 (100)	++ ++ ++	2 4 6	370 (100)	+ + + ++	2 4 6 20		?
1, 2, 4-トリクロロベンゼン	185 (100)	+ ++ ++ ++	2 4 6 20	370 (100)		2 4 6 20	-	++
ブロモホルム	185 (100)	+ + ++ ++	2 4 6 20	370 (100)	++ ++ ++	2 4 6 8	+	++
クロロホルム	4900 (1000)		2 4 6	4000 (1000)		2 4 6 20	+	++
アセチルアセトン	196 (100)		2 4 6 20	410 (100)		2 4 6 24		+
グリキサール	408 (100)	+ +	2 4 6	350 (100)	++ ++ ++	2 4 6	+	++ ++
イソソ	490 (100)	++	2	350 (100)		2 4 6 24		r r
アクリレイン	408 (100)	+	2	35 (10)		2 4 6 8	+	++
トリクロロエチレン	490 (100)		2 4 6 20				+	
テトラクロロエチレン	490 (100)	- +	2 4 6 20				+	+ +

S9- ; 代謝活性 無

S9+ ; 代謝活性 有

k ; 細胞死

r ; 逆転

++ ; 強陽性

+ ; 陽性

- ; 陰性

Ames test ; RTECS 20)

Rec-assay ; Matsui et al. 23)

は $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) に対しての、代謝活性なし (-S9mix) と代謝活性あり (+S9mix) の結果を記した。反応の陽性、陰性の表示 (+, -, +, -) は、被験物質を菌濁液に投与した直後からの反応時間2~24時間に対して示されており、各々溶媒ブランクの値に対して、前述と同じで判定方法によった。また同様にAmesテストとRec-assay法の結果を併記した。

本表より、これら化学物質と試験菌株との反応時間を常法の2時間に比して、より長くとることで、陽性反応を強く呈したのがあることがわかる。

たとえば、m-ジクロロベンゼンは+S9mixで、濃度 $370\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 0.0666^{-1}$ ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) の場合、2~6時間でも陽性を示していたが、反応開始後20時間において、強陽性を呈するようになった。

また-S9mixでのブフェルムも2時間で陽性を示したが、よりその陽性反応を強く呈するようになった。+S9mixにおいては2時間では陰性と判定されていたが、4時間以後、強い陽性を示すようになった。さらにクロルムは比較的高い濃度 ($1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) において反応時間を長くとることにより、+-S9mixの双方において陽性を呈するようになった。トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンも-S9mixにおいて、反応20時間後に陽性反応を示した。

このように本研究で扱った有機塩素化合物は、表3-2における反応2時間での判定では、Ames法において陽性を示したデータに対し、umuテストでは陰性と判定されたものが比較的多かったが、反応時間を長くとることにより陽性反応を呈するものがあることがわかった。

一方、Rec-assayの結果と比較してみると、Rec-assayで陰性と判定された物質は、-S9mixでの1, 2, 4-トリクロロベンゼン、ブフェルム、クロルム、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンであったが、umuテストでは陽性を示し得た。逆にRec-assayで1, 2, 4-トリクロロベンゼンは+S9mixで陽性と判定されたが、umuテストでは20時間の反応時間をとっても陰性であった。ここで双方のテストで必ずしも同一の投与濃度、培養条件でなく、しかも試験菌株が異なるゆえに、これらの結果をもってただちにassayの優劣を論じられないことには注意を要する。

また表3-3で示したオゾン処理生成物の反応中、反応時間を長くとることでより陽性反応を強く示すようになったケースが示されていた。アセチルアセトン+S9mixで、反応2時間後では陰性反応しか示しえなかったが、反応24時間後には強い陽性反応を示すようになった。グリチザールは-S9mixの場合、反応4時間後に陽性を示しはじめた。イソは、表3-3中で濃度 $490\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 0.0666^{-1}$ ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) で細胞死が観察されたが、 $350\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 0.0666^{-1}$ ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) に減じた結果、反応開始24時間後にして、強い陽性を示すようになった。この場合は反応2時間で細胞死と判定したものの、結局静菌状態にあり、増殖が抑制されていたと考えられる。さらにアクリリンの-S9mixの場合も、濃度を $408\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot 0.0666^{-1}$ ($100\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) と増加させた場合に反応2時間で陽性反応を呈した。

以上の結果より、常法2時間の化学物質と菌懸濁液に反応時間に対して、比較的長時間反応させてやることにより、より強く陽性反応を示す物質があり、遺伝毒性の判定を明確にすることができた。

ここで最小投与濃度は、試験菌株がpreincubationを終えた後に化学物質を与えたときの濃度であり、実際に細胞内に化学物質が入り、DNAに損傷を与えるよ

うな濃度ではない。しかしながら、化学物質が分子の単位でDNAに何らかの損傷を与えることを考えると、現実の投与濃度とは、DNA塩基対当りの化学物質の分子数で表すことが適当であろう。そこでDNA塩基対の数は、どの細胞とも同数を有していると考え、1細胞当りの化学物質の投与分子数を計算した。これを各化学物質の遺伝毒性陽性を示した最小の値を図3-2に示した。この図で示されている値を本研究中では「遺伝毒性指数」と定義した。この遺伝毒性指数が小さいほど、つまり図中で下方に向

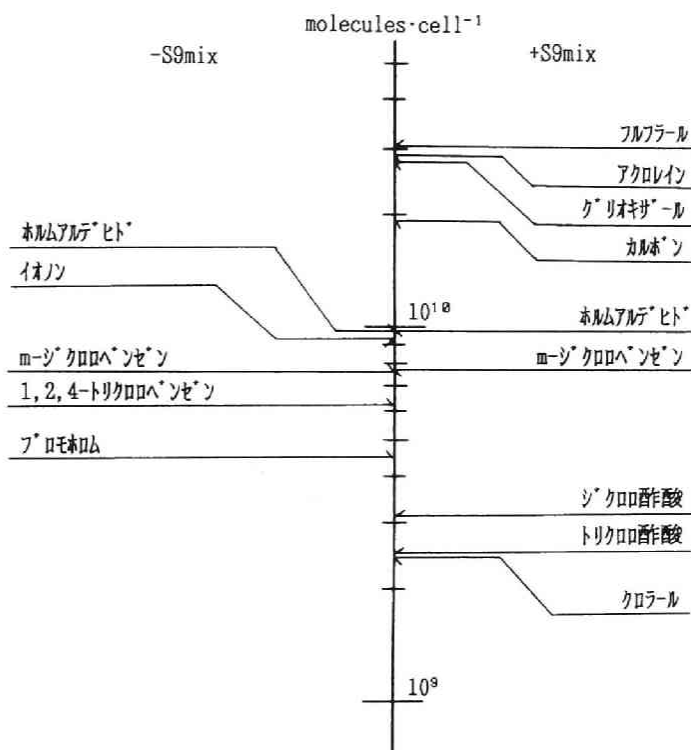


図3-2 遺伝毒性指数

かうにしたがい、遺伝毒性の強い化学物質であることが示されている。

Matsui et al.²³⁾は、Rec-assayにおいて得られたRec-gram値を有機塩素化合物、カルニル化合物について示している。これはRec⁺とRec⁻の増殖曲線の差をプロット変換した値をRec⁻のC50値で除したものである。「遺伝毒性指数」が陽性を検出した最小投与量（反応2時間）であり、各物質で比較するもので指標としての概念は異なる。Rec-assay中の1,2,4-トリクロロベンゼン、ブロホルム、ホルムアルデヒド、グリオキサールは比較的強いDNA損傷性物質と位置づけられている物質が、図3-2中に陽性を示すものとして表されている。図では陽性物質に遺伝毒性指数は10⁹~10¹⁰ molecules·cell⁻¹の範囲に分布し、これら化学酸化副生成物の遺伝毒性を示す濃度範囲が整理できた。-S9mix系、+S9mix系ともに塩素処理生成物である化学物質が、オゾン処理生成物に比し、比較的強い遺伝毒性物質であることがわかる。

2-5 まとめ

水の塩素処理、あるいはオゾン処理により生成するとされている化学物質に関して、umuテストを実施し、その遺伝毒性について検討した。得られた成果を以下に要約する。

①塩素処理生成物とされる化学物質19種中、菌体と化学物質との反応時間2時間で陽性を示した物質は-S9mixでは、m-ジクロロベンゼン、1,2,4-トリクロロベンゼン、ブロホルムであ

り、+S9mixでは、m-ジクロロベンゼン、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、クロールであった。またS9mixの投与により判定値(A-B)/Bを増した物質は、クロロベンゼン、p-ジクロロベンゼン、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、クロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、クロールであった。さらにS9mixの投与で反応2時間内で増殖がみられず、細胞死と判定されたものは、1,2,4-トリクロロベンゼン、ブロモホルムであった。

②オゾン処理生成物とされる化学物質18種中、反応時間2時間で陽性反応を呈したものは-S9mixでは、ホルムアルデヒド、イオンであり、+S9mixでは、ホルムアルデヒド、フルワール、カルボニルグリコザール、アクロレインであった。S9mixを投与して反応2時間内に増殖がみられなかった物質は、イオンであった。

③試験菌株と化学物質との反応時間を2～24時間と比較的長くとることで、陽性に転じた、あるいは陽性反応でもその遺伝毒性強度をさらに増した物質を検索した。以下に示す。

-S9mix; クロホルム、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、
グリコザール、イオン

+S9mix; m-ジクロロベンゼン、ブロモホルム、クロホルム、
アセチルアセトン、イオン、アクロレイン

④これら被検化学物質の遺伝毒性の大きさを、投与分子数/単位細胞（遺伝毒性指数）で整理することで、細胞に与えた負荷に対する遺伝毒性の定量的表現ができた。これはAmesテストで示される投与量/plateに比せば、より定量的な表現で示すことができた。また、化学酸化による副生成物のいくつかに関しては、標準の2時間内では増殖阻害が起こり、このためにSOS反応が遅延するため、反応を長時間とした方がよいと考えた。これによってAmesテストとほぼ同様の結果が得られることがわかった。このように長時間の反応時間をとってもAmesテストの2晩培養やRec-assayにおける対数増殖期の追跡に比せば、簡便な方法であると考えられる。

第3節 染色体異常誘発性

3-1 概説

前節では細菌細胞により、化学酸化処理副生成物の遺伝毒性を検討した。ここでは、二次スクリーニングとして、哺乳動物細胞による染色体異常誘発性をumuテストでの陽性化学物質に関して適用してみた。

染色体異常は、その存在が遺伝障害の大きな原因となりうるものであり、遺伝的な突然変異、すなわち変異原性の誘発を示唆するものである。しかしながら染色体異常はその大部分が優性の有害効果を示し、染色体の一部が欠失すると、細胞は通常長くは生存できない。そのため全ての染色体異常が次世代に引き継がれて遺伝的障害となって現れるとは限らない。したがって判定結果から直接遺伝的障害度を断定することは困難で、細菌細胞などの他のスクリーニングと比較検討する必要があるが、薬事法(1984)においては、Ames法による細菌細胞試験、染色体異常試験、小核試験を施すことが変異原試験のガイドラインとして制定され、染色体異常試験は二次スクリーニングとして位置づけられている。

本節で適用している染色体異常試験(chromosomal aberration test)は、チャイニーズハムスター細胞を用いたフラスコ内(in vitro)試験である。

被検化学物質は前節で陽性と判定された化学物質で以下に示す物質である。

塩素処理における副生成物

- (1)クロロホルム (2)ブロモホルム (3)1,2,4-トリクロロベンゼン (4)m-ジクロロベンゼン
(5)ジクロロ酢酸 (6)トリクロロ酢酸 (7)クロラール

オゾン処理に関する副生成物

- (1)ホルムアルデヒド (2)フルアル (3)アクロレイン (4)グリオキサール
(5)カルボソ (6)イオソ

3-2 染色体異常試験法

染色体異常試験法は、基本的な方法は、石館によるin vitro試験法²⁷⁾²⁸⁾であり、これに若干の操作上の検討を加えた変法によったものである。図3-3に本節で用いた染色体異常試験法の操作手順を示す。

試験に用いた細胞は、新生チャイニーズハムスター雌肺の繊維芽細胞(CHL/IU)で、初代培養株は大日本製薬より購入した。凍結保存してあるCHL/IU細胞を、25cm²のホリスチン製フラスコ中のEagleの最小培地(Eagle's MEM, Flow社)10mLに播種した(3 × 10⁴ 細胞)。培地中には、10%の仔牛血清(熱非動化処理後、Flow社)、1%のL-グルタミン、さらにマイコプラズマ汚染除去のためにMC-210(大日本製薬 50 mg・L⁻¹)を0.1mL、すなわち最終濃度0.5mg・L⁻¹となるよう添加している。細胞は、5%CO₂ガス下で、37℃、飽和水蒸気下で培養した。

約72時間後、細胞が対数増殖期となったところ(約5×10⁴ cell s・mL⁻¹培地)で、被検化学物質の濃度列を作成し、培地中に投与した。これをさらに24時間培養

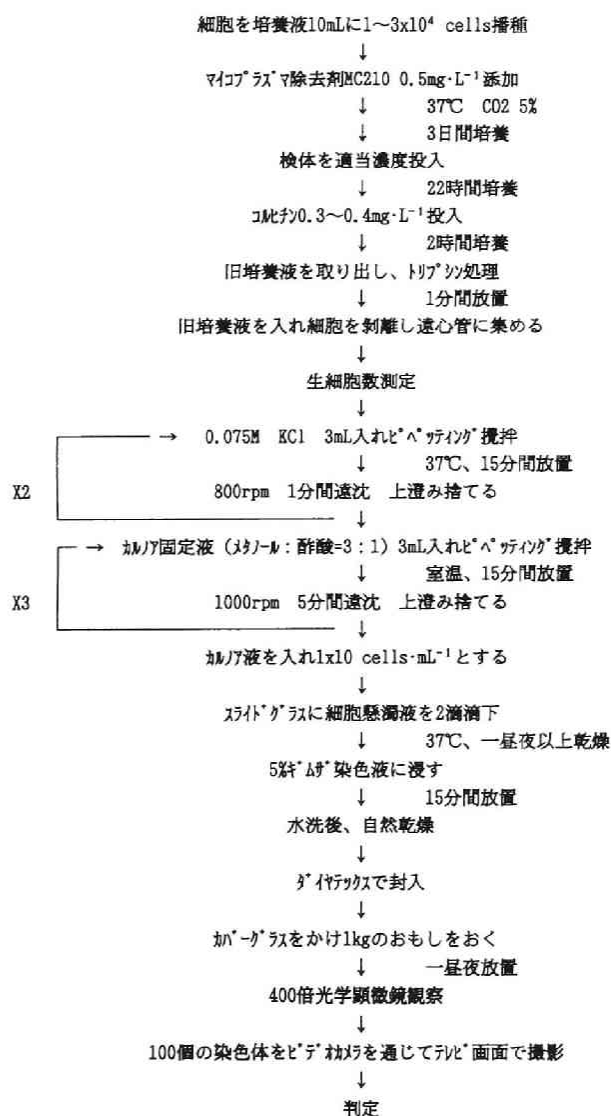


図3-3 染色体異常試験法

した。培養終了の2時間前に、染色体標本を作成するために、培地中へコルヒチンを $0.3 \sim 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ となるよう添加した。その後細胞は、トリプシン処理によりフラスコから剥離し、75mM塩化カルシウム溶液中に浮遊させ、15分間、37℃にて2回低張処理した。さらに遠心分離で収集された細胞にカルノ固定液（3:1のメタノール：酢酸液）を入れ、15分間ずつ3回固定した。この細胞液を、湿らせたスライドガラス上に1滴落とし、風乾した後、37℃で一晩乾燥し、染色体の伸張を図った。スライドガラスを5%ギムザ染色液（pH6.8）に15分間浸し、染色体を染色した。これを光学顕微鏡下にて観察し、ビデオカメラ（CCD video camera C3077, HAMAMATSU）にてモニターに染色体像を表し、その異常誘発を観察し、必要に応じてこれをビデオテープ（VC-DS1100, S-VHS, NEC）に記録した。染色体像は、1検体に関して100個観察した。染色体異常の判定は、以下に示す石館のものに依った。

	染色体異常誘発率	> 10%	+	陽性
10% >	染色体異常誘発率	> 5%	+ -	疑陽性
5% >	染色体異常誘発率		-	陰性

実験毎に無処理細胞（培養細胞に何も投与しない系）、及び溶媒のみを処理した細胞（培養細胞に溶媒のみを投与した系）を陰性対照とした。CHL/IU細胞は、染色体構成のバックグラウンドの異常が少ないとされており²⁹）、染色体異常を持つ細胞の出現率が5%を超える場合には、実験を新たに繰り返さねばならないとされている²⁷）。

3-3 化学物質の細胞生存率への影響

染色体異常試験における濃度列の選定において、石館は、細胞の増殖抑制が約50%となる濃度を基準とし、原則的にその前後3濃度を選択することとしている²⁷）。しかしながら被験物質投与後の細胞生存率が、化学的ストレスにより増殖阻害を引き起こし、50%以下となった場合には経験的に十分な量

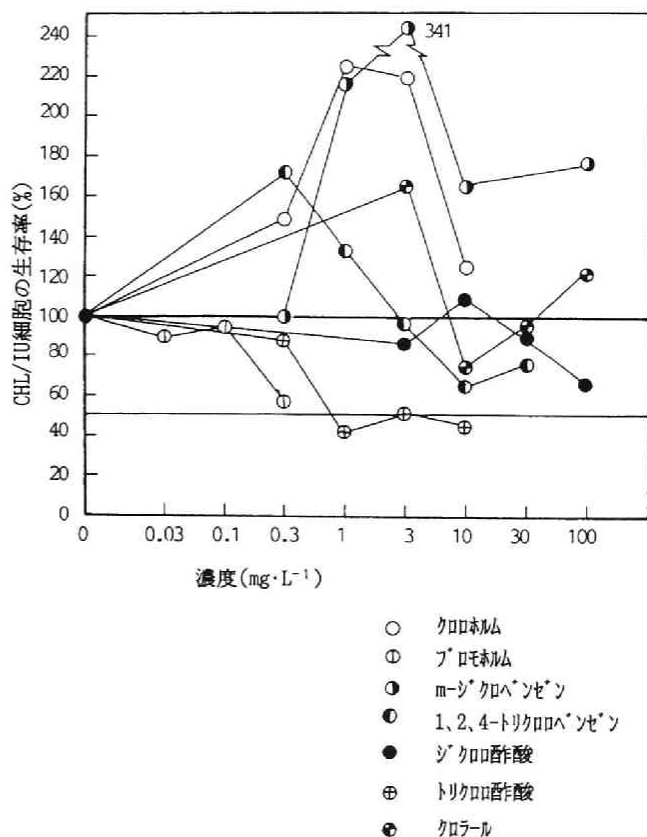


図3-4 塩素処理副生成物による細胞生存率

の染色体標本を得ることができなかった。そこで本実験においては、細胞生存率が50%異常となるような投与化学物質の濃度列で試験を実施した。

細胞生存率は次式によって算出している。

$$\text{細胞生存率(\%)} = \frac{\text{被験物質を投与した系における生細胞数}}{\text{溶媒のみを投与した系における生細胞数}} \times 100$$

ここで生細胞数は、被験物質投与後、24時間のトリパソフル染色によって計数した生細胞数である。

図3-4と、図3-5には塩素処理における副生成物と、オゾン処理による副生成物を投与した場合の、投与濃度に対する細胞生存率を各々示した。

図3-4ではジクロ酢酸、トリクロ酢酸において投与濃度が増大するにつれて生存率が減少している。これに対してクロホルム、m-ジクロベンゼン、1,2,4-トリクロベンゼン、クロールでは濃度の増加にともない、生存率は増加傾向にあるが、さらに濃度を高くすると減少に転じた。クロホルムは $0.03 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ の範囲では投与濃度に依存せず、生存率は60~90%の範囲に存在した。

図3-5ではグリオキサール以外の化学物質では、投与濃度の増加にしたがって、生存率は減少している。これに対し、グリオキサールに対する生存率はわずかに増加を示した。

細胞への被検化学物質の投与濃度の増加にともない、細胞の生存率が増加する場合は、被検化学物質が細胞の増殖阻害を誘発しない物質であるといえよう。染色体異常が誘発されても、細胞が死に至れば、突然変異の障害は起こり得ない。逆に染色体異常誘発性を有しながら、増殖も促進される場合は、より突然変異誘発への危険性が高いといえよう。この観点からクロホルム、m-ジクロベンゼン、1,2,4-トリクロベンゼン、クロール、グリオキサールはいわゆる増殖阻害を呈する細胞毒性はみられなかったものの、染色体異常誘発性については着目する必要がある。

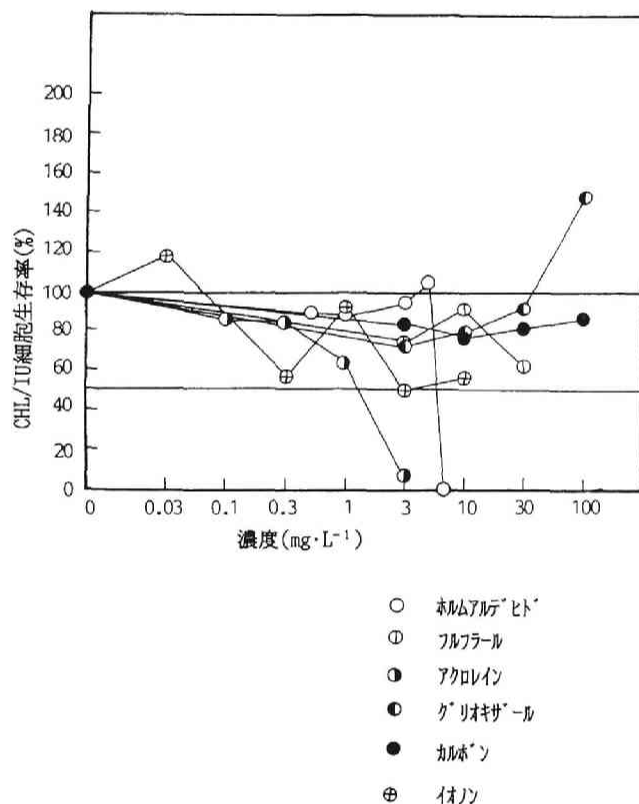


図3-5 オゾン処理副生成物による細胞生存率

3-4 染色体異常誘発性の濃度効果

図3-6、3-7に塩素処理副生成物、オゾン処理副生成物各々の染色体異常試験による濃度効果を示した。横軸には投与濃度を、縦軸には異常誘発性を表し、図中に疑陽性5%、陽性10%のラインを引いている。

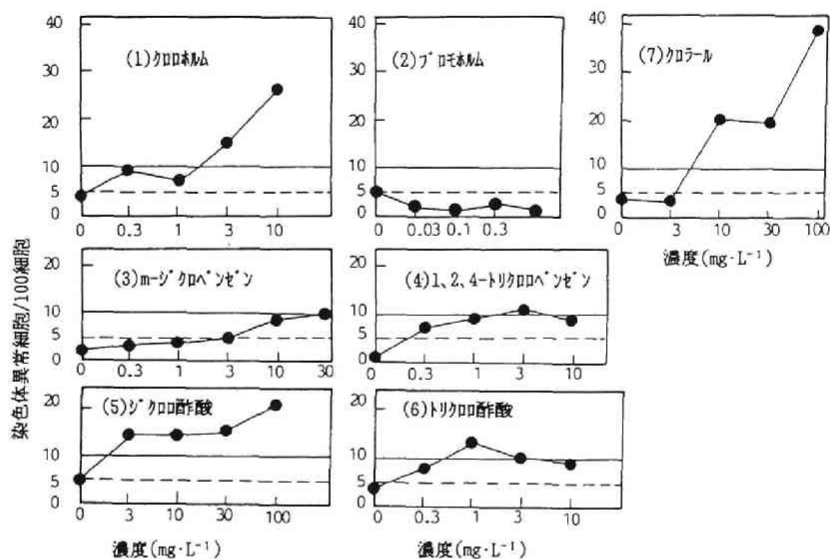


図3-6 塩素処理副生成物による染色体異常発現率

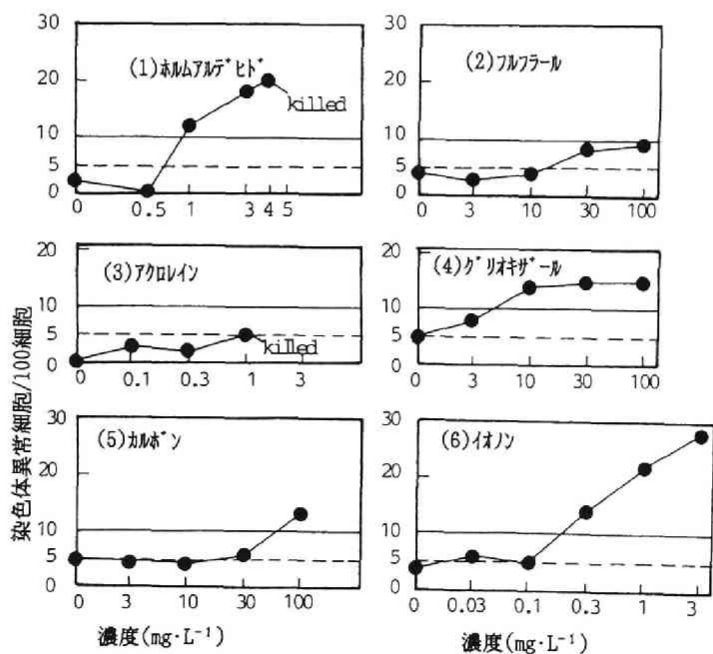


図3-7 オゾン処理副生成物による染色体異常発現率

図よりプロモホルムを除く被検物質で染色体異常誘発率が、投与濃度に対して濃度依存性を有している。しかしながらm-ジクロロベンゼンやトリクロ酢酸、あるいはホルムアルデヒド、アクリレインは濃度を上げていくと増殖阻害の効果が顕著になるようである。

これらのdose-response曲線から読み取れる各物質の陽性検知濃度を表3-5に示した。表中にはRTECS²⁶⁾及び石館²⁷⁾の結果を併せて示している。塩素処理副生成物のうち、本実験ではプロモホルムを除く全ての被検物質で陽性を示した。一方、オゾン処理副生成物では、フルワールが疑陽性を示し、アクリレインが $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上の濃度で細胞死を示した他は、陽性と判定されている。

表3-5 染色体異常試験結果

化学物質	判定	濃度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref of RTECS	濃度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	細胞	石館 ²⁷⁾ 濃度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
クロホルム	+	3	-(S9mix)	400	Hum lymph	+- 400 killed 125
プロモホルム	-	-				
m-ジクロロベンゼン	+	3				
1,2,4-トリクロロベンゼン	+	30				
ジクロロ酢酸	+	3				
トリクロロ酢酸	+	1				
クロラール	+	10				
ホルムアルデヒド	+	1	+	15	CHL	+ 15
フルワール	+-	-	+		CHO	
アクリレイン	killed	-				
グリオキサール	+	10				
L-カルボソ	+	100				
イオン	+	0.3	+	0.005	B241	

先に示した生存率と、この染色体異常誘発率の関係をみれば、染色体異常誘発性が陽性にも関わらず、細胞生存率の増加が認められる化学物質は、クロホルム、m-ジクロロベンゼン、さらにグリオキサールであり、これらの物質は染色体異常の結果として起こるであろう細胞突然変異に関与していく可能性が高いと推察される。

3-5 構造異常に関する考察

染色体の構造異常として、

ギャップ型(gap)

(染色分体ギャップ chromatid gap, ctg、染色体ギャップ chromosome gap, csg)

切断型(break)

(染色分体切断 chromatid break, ctb、染色体切断 chromosome break, csb)

交換型(exchange)

(染色分体交換 chromatid exchange, cte、染色体交換 chromosome exchange, cse)、

その他(細片など)に着目することとした。数値異常については倍数体のみに着

目することとした。

染色体異常の像の例を図3-8に示す。この像はフルラルを $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 投与したもので染色分体交換型が観察される。

表3-6に本実験において発現した染色体の構造異常の種類と出現頻度を示す。染色体型の異常が若干観察されたものの、各物質ともに誘発したのはほとんど染色分体型異常であり、特にギャップが多く観察できた。このことは、化学物質のDNAに対する損傷は、放射線のDNA損傷の場合と異なり、直接染色体異常に影響せず、DNA合成期を経過することによってはじめて染色体異常として発現することによると考えられている²⁸⁾。

構造異常の種類では、ギャップ型よりも切断型の方が損傷の度合いが大きく、また既知発癌物質ではギャップや切断型の誘発に加えて、交換型の異常を多く誘発する傾向にあるという²⁷⁾。



図3-8 染色分体交換型異常の例

表3-6 構造異常

化学物質	濃度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	異常細胞 % 判定	染色体異常細胞/100細胞					
			chromatid gaps	chromosome gaps	chromatid breaks	chromosome breaks	exchanges	polyloidy
クロロム	無処理	3	1	0	0	0	3	0
	対照	4	4	0	0	0	0	0
	0.3	9 +/-	5	1	1	0	2	0
	1	7 +/-	3	1	1	0	2	0
	3	15 +	6	1	5	0	2	1
	10	26 +	6	3	9	0	8	0
ブプロピル	対照	4	3	0	0	0	1	0
	0.03	3	2	0	0	0	1	0
	0.1	1	1	0	0	0	0	0
	0.3	3	3	0	0	0	0	0
m-ジクロロベンゼン	対照	1	0	1	0	0	0	0
	0.3	7 +/-	2	0	1	0	4	0
	1	9 +/-	6	2	0	0	1	0
	3	11 +	6	3	0	0	1	0
	10	9 +/-	7	1	0	0	1	0
	30	9 +/-	6	3	0	0	0	0
	100	13 +	10	1	0	1	1	0
1,2,4-トリクロロベンゼン	対照	2	2	0	0	0	0	0
	0.3	3	3	0	0	0	0	0
	1	4	2	2	0	0	0	0
	3	5 +/-	3	2	0	0	0	0
	10	9 +/-	6	2	0	0	1	0
	30	10 +	6	1	2	0	1	0

化学物質	濃度 (mg·L ⁻¹)	異常細胞		染色体異常細胞/100細胞				
		%	判定	chromatid gaps	chromosome gaps	chromatid breaks	chromosome breaks	exchanges polyloidy
シクロ酢酸	無処理	1		1	0	0	0	0
	対照	5		4	0	1	0	0
	3	14	+	13	0	1	0	0
	10	14	+	11	0	2	0	0
	30	15	+	10	1	4	0	0
	100	21	+	17	0	4	0	0
トリクロ酢酸	無処理	1		1	0	0	0	0
	対照	4		4	0	0	0	0
	0.3	8	+/-	3	0	0	0	0
	1	13	+	11	1	0	0	1
	3	10	+	7	0	1	0	2
	10	9	+/-	6	0	3	0	0
クロラール	無処理	1		1	0	0	0	0
	対照	4		4	0	0	0	0
	3	3		3	0	0	0	0
	10	20	+	12	2	6	0	0
	30	19	+	13	3	2	0	1
	100	39	+	25	5	7	1	1
ネムアルデヒド	無処理	0		0	0	0	0	0
	対照	2		2	0	0	0	0
	0.5	0		0	0	0	0	0
	1	12	+	3	2	0	1	6
	3	18	+	0	0	6	0	12
	4	20	+	0	0	18	2	0
	5	kill	kill					
フルフロール	無処理	1		1	0	0	0	0
	対照	4		4	0	0	0	0
	3	3		3	0	0	0	0
	10	4		3	0	1	0	0
	30	8	+/-	4	0	2	0	2
	100	9	+/-	8	0	1	0	0
アクロレイン	無処理	2		2	0	0	0	0
	対照	0		0	0	0	0	0
	0.1	3		3	0	0	0	0
	0.3	2		2	0	0	0	0
	1	5	+/-	4	1	0	0	0
	3	kill	kill					
グリサザール	無処理	1		1	0	0	0	0
	対照	5		4	0	1	0	0
	3	8	+/-	7	0	0	0	1
	10	14	+	12	0	1	0	1
	30	15	+	13	1	1	0	0
	100	15	+	11	0	3	0	1
カルネン	無処理	1		0	0	1	0	0
	対照	5		4	0	0	0	1
	3	4		3	0	0	1	0
	10	4		1	1	1	1	0
	30	6	+/-	6	0	0	0	0
	100	13	+	12	0	0	0	1
イオン	無処理	1		1	0	0	0	0
	対照	4		4	0	0	0	0
	0.03	6	+/-	5	0	1	0	0
	0.1	5	+/-	4	0	0	0	1
	0.3	14	+	10	2	2	0	0
	1	22	+	16	2	2	0	2
	3	28	+	18	6	6	0	2

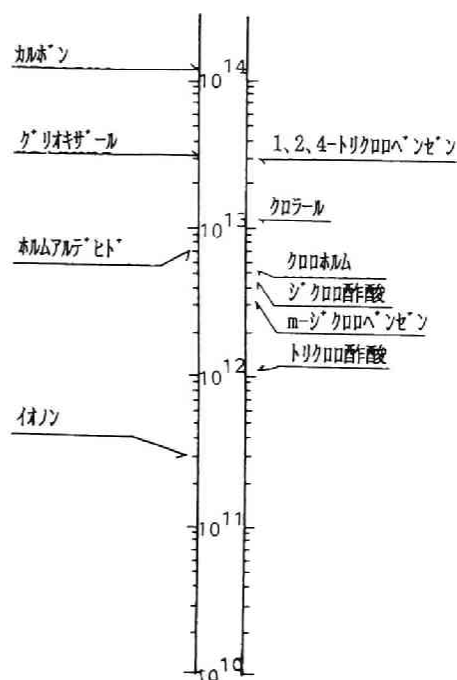
この表から、染色分体切断型の異常は、クロホルム、ジクロ酢酸、クロラール、ホルムアルデヒド、イオンに多くみられた。さらに上記のように大きな損傷と考えられる交換型の異常は、他の細胞に比べてクロホルム、ホルムアルデヒドを投与した細胞に比較的多く発現している。

3-6 化学物質の染色体異常誘発性

染色体異常試験においてもdose-responseについてはdoseは濃度表示とするのが一般的であるが、化学物質の試験生細胞に対する負荷量を考えるならば、前節のバクテリアアッセイでの遺伝毒性指数と同様に陽性を検出できた最小濃度を、CHL/IU細胞1cell当りの化学物質の投与分子数として表現した。この結果を図3-9に示す。本図中、下方に示された物質ほど染色体異常誘発作用が強いことを表している。

この結果より、被検化学物質の陽性検出の値は $10^{11} \sim 10^{14}$ molecules \cdot cell $^{-1}$ の範囲にあることがわかる。これは前節の細菌細胞での遺伝毒性指数が $10^9 \sim 10^{10}$ molecules \cdot cell $^{-1}$ 程度であったことに比較するとオーダーが大きい。細菌細胞と哺乳動物細胞の有するDNAの塩基対数に 10^3 の差があることからほぼ妥当な値と考えられる。

塩素処理副生成物中で最も染色体異常誘発作用が強いのはトリクロ酢酸であり、オゾン処理副生成物としてはイオンが最大の染色体異常誘発性を示すことがわかった。また塩素処理、オゾン処理の各々の代表的な副生成物として知られるクロホルムとホルムアルデヒドでは、クロホルムの方が若干誘発性が強いことが示された。



染色体異常を示した細胞当りの化学物質の投与分子数(分子 \cdot cell $^{-1}$)

図3-9 染色体異常を示した細胞当りの化学物質の投与分子数

3-7 まとめ

細菌細胞での遺伝毒性試験umuテストにおいて陽性を示した塩素処理及びオゾン処理副生成物を、CHL/IU細胞で染色体異常誘発性を検討し、両化学酸化処理による副生成物の遺伝毒性を同定された生成化学物質を直接アッセイに投与することにより評価した。

①塩素処理副生成物中、陽性を示したのは、クロホルム、1,2,4-トリクロロベンゼン、m-ジク

クロロベンゼン、ジクロ酢酸、トリクロ酢酸及びクロールであった。

②オゾン処理副生成物中、陽性を示したのは、ホルムアルデヒド、フルワール、グリオキサール、カルボソ、及びイオンであった。

③染色体異常誘発率が陽性であり、かつ細胞の増殖が認められる、いわゆる突然変異という見地からみると危険性が高いと考えられる化学物質は、クロホルム、m-ジクロロベンゼン及びグリオキサールであった。

④染色分体切断型の異常は、クロホルム、ジクロ酢酸、クロール、ホルムアルデヒド及びイオンに多くみられた。また大きな損傷として考えられる交換型の異常は、クロホルム、ホルムアルデヒドに比較的多く観察できた。

⑤細胞当りの投与化学物質分子数（遺伝毒性指数）による誘発性の表現により、トリクロ酢酸と、イオンが強い誘発性を示すことが表された。またホルムアルデヒドよりもクロホルムが若干強い誘発性を示していた。これらは $10^{11} \sim 10^{14}$ molecules・cell⁻¹で誘発しており、細菌細胞に対して $10^2 \sim 10^4$ 倍の負荷であった。このように従来のdose-responseにおける濃度表示に変わり、負荷表示とすることで、化学物質相互の遺伝毒性の比較を定量的に行えることが示唆された。

第4節 結語

本章では、浄水、下水の消毒に使用される塩素処理、あるいはオゾン処理により生成する化学物質に関して、その安全性の検討のため、遺伝毒性について検討した。しかしながら両酸化法による副生成物は①濃縮法が異なること、②遺伝毒性が検出できたとしても、どの分画に活性があるかを同定する必要のあること、③そこで先に同定された副生成物に関して、代表的なものを各々遺伝毒性を評価していくほうが簡便、かつ迅速な結果が得られるとの立場から遺伝毒性試験を実施した。

まず一次スクリーニングとして、バクテリアッセイであるumuテストを各々の化学物質に適用した。

①塩素処理生成物とされる化学物質19種中、菌体と化学物質との反応時間2時間で陽性を示した物質は以下の通りである。

-S9mix m-ジクロロベンゼン、1,2,4-トリクロロベンゼン、ブロホルム

+S9mix m-ジクロロベンゼン、ジクロ酢酸、トリクロ酢酸、クロール

またラット肝酵素(S9mix)の投与によりumuテストにおける判定強度値(A-B)/Bを増した物質を以下に示す。

クロロベンゼン、p-ジクロロベンゼン、ジクロメタノール

1,2-ジクロロエタノール、クロ酢酸、ジクロ酢酸、トリクロ酢酸、クロール

S9mixの投与で反応2時間内で増殖がみられず、細胞死と判定されたものは、1,2,4-トリクロロベンゼン、ブロホルムであった。

②オゾン処理生成物とされる化学物質18種中、反応時間2時間で陽性反応を呈したものを以下に示す。

-S9mix ホルムアルデヒド、イオン

+S9mix ホルムアルデヒド、フルフラール、カルボン、グリオキサール、アクロレイン

S9mixを投与して反応2時間内に増殖がみられなかった物質は、イオンであった。

③遺伝毒性の強さを表す指標として、各化学物質の陽性を示した最小の、1細胞当りの化学物質の投与分子数を計算し、これを遺伝毒性指数と定義した。この遺伝毒性指数が小さいほど遺伝毒性の強い化学物質であることが示される。被検化学物質は $10^9 \sim 10^{10}$ molecules \cdot cell $^{-1}$ で陽性を示した。検討した化学物質中では、-S9mix系ではブロモホルムが、+S9mix系ではジクロ酢酸、トリクロ酢酸、クロラールが比較的強い遺伝毒性物質であることがわかった。

④試験菌株と化学物質との反応時間を2～24時間と比較的長くとることで、陽性に転じた、あるいは陽性反応でもその遺伝毒性強度をさらに増した物質を検索した。以下に示す。

-S9mix; クロホルム、トリクロエチレン、テトラクロエチレン、
グリオキサール、イオン

+S9mix; m-ジクロベンゼン、ブロモホルム、クロホルム、
アセチルアセトン、イオン、アクロレイン

次に細菌細胞での遺伝毒性試験において陽性を示した化学物質を、二次スクリーニングとして哺乳動物細胞を用いたCHL/IU細胞で染色体異常誘発性を検討した。結論を以下に示す。

⑤塩素処理生成物中、陽性を示したのは、クロホルム、1,2,4-トリクロベンゼン、m-ジクロベンゼン、ジクロ酢酸、トリクロ酢酸及びクロラールであった。またオゾン処理生成物では、ホルムアルデヒド、フルフラール、グリオキサール、カルボン、及びイオンが陽性と判定できた。この中で染色体異常誘発率が陽性であり、かつ細胞の増殖が認められる化学物質は、クロホルム、m-ジクロベンゼン及びグリオキサールであった。

⑥染色分体切断型の異常は、クロホルム、ジクロ酢酸、クロラール、ホルムアルデヒド及びイオンに多くみられた。また大きな損傷として考えられる交換型の異常は、クロホルム、ホルムアルデヒドに比較的多く観察できた。

⑦細胞当りの投与化学物質分子数（遺伝毒性指数）による誘発性の表現により、トリクロ酢酸と、イオンが強い誘発性を示すことが表された。またホルムアルデヒドよりもクロホルムが若干強い誘発性を示していた。各々の指数は $10^{11} \sim 10^{14}$ molecules \cdot cell $^{-1}$ で細菌細胞での値に比し、 $10^2 \sim 10^4$ 倍であった。

引用文献

- 1)平成3年度オゾン関連設備建設情報(1992)、OZONE NEWS in Japan No.3、日本オゾン協会、13-15
- 2)Loper, J.C.(1980):Mutagenic Effects of Organic Compounds in Drinking Water, Mutation Research,76,241-268.
- 3)Vartianen T. et. al.(1987):Comparison of Solvent Extractions and Resin Adsorption for Isolation of Mutagenic Compounds from Chlorinated Drinking Water with High Humus Content, Water Research,21(7),773-779.
- 4)亀井翼、丹保憲仁ら(1985):塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類が

ら生成する成分の環境変異原性、水道協会誌、54(11)、25-33.

5) Monarca, S. et. al. (1985): Microscale Fluctuation Assay coupled with Sep-pak Concentration as a Rapid and Sensitive Method for Screening Mutagens in Drinking Water, Water Research, 19(10), 1209-1216.

6) Meier, J.R., et. al. (1983): Formation of Mutagens following Chlorination of Humic Acid, A Model for Mutagen Formation during Drinking Water Treatment, Mutation Research, 118, 25-41.

7) Fielding, M. & Horth, H. (1987): The Formation and Removal of Chemical Mutagens during Drinking Water Treatment, Organic Micropollutants in the Aquatic Environment, Kluwer Academic Publishers, 284-298.

8) Kronberg, L. et. al. (1988): Identification and Quantification of the Ames Mutagenic Compound 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone and its Geometric Isomer (E)-2-chloro-3-(dichloromethyl)-4-oxobutenoic Acid in chlorine-Treated Humic Water and Drinking Extracts, Environmental Science & Technology, 22(9), 1097-1103.

9) Holmbom, B. et. al. (1984): Fractionation Isolation and Characterization of Ames mutagenic Compounds in Kraft Chlorination Effluents, Environmental Science & Technology, 18, 333-337.

10) 山田春美 (1987): オゾンおよび塩素による化学酸化処理に関する研究、京都大学学位論文、44-71

11) Rice, R.G. (1980): The Use of Ozone to Control Trihalomethanes in Drinking Water Treatment, Ozone Science & Engineering, 2, 75-99.

12) Dolara, P. et. al. (1981): Effect of Ozonation and Chlorination on the Mutagenic Potential of Drinking Water, Bull. Environm. Contam. Toxicol., 27, 1-6.

13) Huck, P.M. et. al. (1989): Pilot Scale Evaluation of Ozone and Other Drinking Water Disinfectants using Mutagenicity Testing, Ozone Science & Engineering, 11, 245-269.

14) Cognet, L. et. al. (1986): Mutagenic Activity of Disinfection By-products, Environmental Health Perspectives, 69, 165-175.

15) Kool, H.J. (1984): Formation and Removal of Mutagenic Activity during Drinking Water Preparation, Water Research, 18(8), 1011-1016.

16) Kool, H.J. & Hrubec, J. (1986): The Influence of an Ozonem chlorine and Chlorine Dioxide Treatment on Mutagenic Activity in (Drinking) Water, Ozone Science & Engineering, 8, 217-234.

17) Hartmenn, P. (1987): Cellular Toxicity and Mutagenicity Assays from On-site Sampling of Drinking Water Treatment Plants using Multistage Ozonation, Ozone Science & Engineering, 9, 179-194.

18) Bourbigot, M.M. et. al. (1986): Role of Ozone and Granular Activated Carbon in the Removal of Mutagenic Compounds, Environmental Health Perspectives, 69, 159-163.

- 18) 宗宮 功、山田春美(1987); オゾン処理特集 水中有機物との反応、工業用水、34、71-82.
- 19) 宗宮 功、遠藤伸一、藤井滋穂(1980); 塩素処理に関する基礎的研究(Ⅲ) - 有機塩素化合物の生成について -、下水道協会誌、17(188)、1-12.
- 20) Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, 1981-82 EDITION and 1983-84 supplement, National Institute for Occupational Safety and Health.
- 21) Zeiger E. (1987); Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity, Cancer Research, 47, 1287-1296.
- 22) McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames B.N. (1975); Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 72, 5135-5139.
- 23) Matsui S., Yamamoto R. and Yamada H. (1989); The Bacillus subtilis/microsome rec-assay for the detection of DNA damaging substances which may occur in chlorinated and ozonated waters, Water Science and Technology, 21, 875-887.
- 24) 柳田友道(1981); 化学的ストレスに対する反応、微生物科学2、学会出版センター所収、405-466
- 25) 茂岡忠義、吉田喜久雄、保坂千登勢、早月陽子、山内文雄(1988); クロロフェノール類の活性汚泥微生物に対する増殖阻害性とその構造および微生物による分解性との関連、衛生化学、34(3)、266-273
- 26) 小田美光(1989); 活性酸素産生に係わる変異株にumu遺伝子導入した菌株を用いた高感度変異原検出系、環境変異原研究、11(2)、p164
- 27) 石館基監修(1983); 染色体異常試験データ集、リアライズ社
- 28) 日本環境変異原学会編(1988); 化学物質による染色体異常アトラス、朝倉書店
- 29) 駒井三千夫(1987); 培養細胞を用いる染色体異常試験、バイオテクノロジー実験マニュアル、三共出版、248-256
- 30) 小野芳朗、宗宮功、河村正純(1991); 化学酸化処理での反応生成物の遺伝毒性に関する研究、水質汚濁研究、14(6)、633-641
- 31) 小野芳朗、宗宮功、上西琴子(1991); 染色体異常試験による化学酸化処理生成物の変異原性に関する研究、土木学会第46回年次講演概要集、1102-1103
- 32) Ono, Y., Somiya, I. & Uenishi, K. (1992); Evaluation of genotoxicity on chemicals produced in chemical oxidation using chromosomal aberration test, Environmental Toxicology and Water Quality, 投稿中

第4章 化学物質に対する構造相関とリスク評価の適用

第1節 概論

一般に化学物質の生細胞に与える毒性という場合には、細胞毒性(cytotoxicity)と、変異原性、発癌性、催奇性などを示す遺伝毒性(genotoxicity)とは区別して用いる必要がある。

細胞毒性は、いわゆる化学物質の細胞に及ぼすストレスとして考えることができる¹⁾。化学的ストレスには、細胞の諸成分、たとえばタンパク質や核酸と無差別に反応して傷害を与えるもの、また核酸及び関連構造体と結合するもの、脂溶性あるいは界面活性をもった化学物質による細胞膜に作用して膜の透過性に障害を起こすもの、さらに酸化剤によるラジカル反応により細胞膜に損傷を起こし細胞内容物の漏出をもたらすものなどが知られている。

化学物質によるDNAの損傷には様々な作用機序、経路があり、多くの研究者により、そのメカニズムの解明が進みつつある。化学物質は細胞中に摂取されてのち、多くの場合、細胞内酵素により代謝活性化されるが、よく知られた酵素として、*シトクロームP450*がある。この酵素は薬物の解毒や活性化を触媒する肝酵素として知られている。通常Ames法や*umu*テストの*S9*mix系ではラット肝中の*シトクロームP450*を用いるようになってきているが、近年はヒト肝中の*P450*酵素群の作用活性についてMeIQ、Trp-p-2、Glu-p-1などについて研究が進んでいる²⁾。またGuengerichは、ヒト肝*P450 2E1*により活性化される癌原性物質として、アクリロニトリル、ベンゼン、四塩化炭素、クロロホルム、メタノール、スチレン、トリクロロエチレン、塩化ビニルなどの化学物質をあげている。これらはいずれも従来ラット肝*P450*系では明確な変異原性、発癌性が示されなかった物質である。たとえばベンゼンは、*P450*酵素によりフェノールとなり、さらにヒドロキノンとなり、最終的にキノンとなる。また四塩化炭素CCl₄は、*P450*によりCCl₃・となり、ついでCCl₃O₂・→Cl₂C=Oとなると報告されている³⁾。

このようなDNA損傷として、塩基の修飾、脱塩基反応、DNA鎖切断(1本鎖、2本鎖)、クロスリンク、インターカレーションなどが知られているが、とくにDNA塩基の修飾(DNA-adducts)は突然変異誘発の起因として注目されている。芳香族アミンで1細胞当たり2000付加体、すなわち10⁷塩基対に1付加体、紫外線では10⁴塩基対に1付加体とされる⁴⁾。アゾ色素である3-methoxy-4-aminoazobenzeneは10⁷塩基対当たり3.8付加体検出されると報告されている。

一方、近年DNA損傷に係わるメカニズムとして、活性酸素の挙動が注目されてきている⁵⁾。この活性酸素(active oxygen)は、化学物質の代謝活性化の結果、近辺に存在する酸素に電子を与え、スーパーオキシド⁻O₂・、ヒドロキシラジカル・OH、1重項酸素¹O₂、過酸化水素H₂O₂や、種々の脂質酸化物(LOO・、L・、LO・)を生成するとされる。これらは紫外線、放射線、亜硫酸ガス、二酸化窒素や、鉄、クロム、ニッケル、コバルト、銅などの重金属の存在下で、それらの触媒作用により生成する⁶⁾とされる。また化学物質では、アスベスト、ベンゼン(a)ピレン、ホルムアルデヒド、グリオキサール、ヒドロキノン、KBrなどは、活性酸素種の生成が考えられる主な変異原物質である⁷⁾。

以上のようにDNA損傷に関しては、細胞に投与する化学物質が決まれば、そ

の損傷の機構は一義的に決ってくると考えてよく、見方を変えれば化学物質の有する構造が細胞毒性や、そのなかのDNA損傷に関係しているとみなされうる。本章では以上のようなDNA損傷の機構を念頭に、化学物質の構造が遺伝毒性誘発に関わっているとの観点より、一連の異性体の構造因子と遺伝毒性との相関を検討した。さらに化学物質の遺伝毒性を測定することにより、水環境中の化学物質のリスク評価を行うため、標的モデルを適用し、実質安全濃度を算出することを試みた。

第2節 芳香族有機塩素化合物の遺伝毒性と構造相関

2-1 概説

細胞に化学物質が何らかの毒性を及ぼす場合、細胞膜上のリン脂質、膜タンパク質、膜の酵素系、さらにはDNAなどへの損傷（塩基対交換、フレームシフト、切断など）が考えられる。ところで、これらの毒性活性を評価する一手法として、化学物質の有する構造上の特徴、特に物理化学的な因子によって、細胞への毒性の誘発を評価し、それらの相関性を検討することが試みられている。これらの研究は、化学物質の構造因子を知ること、その物質の誘発するであろう毒性を予測することに適用しうると考えられる。

たとえば、Shahinら⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾は、芳香族化合物、特に、2,4-ジアミノベンゼンの一連の化合物、m-ジアミノベンゼンの誘導体、単環芳香族アミンなどと、それらが誘発する変異原性との関係の評価をしている。ここでは芳香環の置換基として、アルキル基を考え、各々の一連の化合物に炭素を幾つ有したアルキル基が結合していれば、変異原性を誘発するのか、という観点から検討している。つまり、炭素原子の数によって、分子の電子分布が変化し、それがDNAに及ぼす損傷に影響していると推定している。

Claxton¹¹⁾は、16種類のハロゲン化ピリジンの変異原性をAmes法で測定し、その構造活性を評価している。Ames法で、2位に塩素置換基を有するピリジンと、-CH₂Xを置換基として有するピリジンに変異原性が示された。これはP450酵素存在下では、ピリジンのNが酸化され、N-酸化体の電子吸引力が2位のハロゲンを不安定な状態にして、求核置換反応を起こし易くするためと推定している。

細胞毒性と構造因子を検討した研究例に、微生物のLC50値と、構造因子の相関分析を評価したBirkholtzら¹²⁾、及び茂岡ら¹³⁾¹⁴⁾の研究がある。Birkholtzらはアルキル化キノリンの14の異性体の置換基の位置と蛍光バクテリアへの毒性との相関を得ている。茂岡らは、ミジソのクロフェノール類の服毒死に対して、クロフェノール類の持つ脂溶性と、分子の結合性の指標を相関させて評価している。

本節では、umuテストで検出される遺伝毒性が、構造上の因子により、ある程度評価できるかどうかを検討するために、一連の単環の芳香族有機塩素化合物の構造因子と、その遺伝毒性強度との相関を検討した。

2-2 実験方法

umuテストは前章で述べた方法を用いた。代謝活性S9mix+-両系で実験している。反応時間は、第2章で示したようにm-ジクロベンゼンの様な比較的反応の遅い化学物質も含まれているため、本実験においては2時間と4時間の反応時間を設定し、明確に陽性を検知した4時間のデータを採用した。

各化学物質に対する遺伝毒性のデータは、陽性を示したのものに関しては5回の同じル-チの遺伝毒性試験を実施し、そのうち遺伝毒性強度（(A-B)/B）の最大値と最小値を除き、中間の3データを平均して算出することとした。

被験化学物質は、図4-1に示したような7種類の芳香族有機塩素化合物で、クロベンゼン、クロフェノール、クロニトロベンゼン、クロアニリン、クロトルエン、クロ安息香酸、クロアルデヒドの異性体であり、総計96個の化合物に関して、それらの遺伝毒性を測定した。表4-1にこれら被験化学物質の一覧と、その入手先を示す。

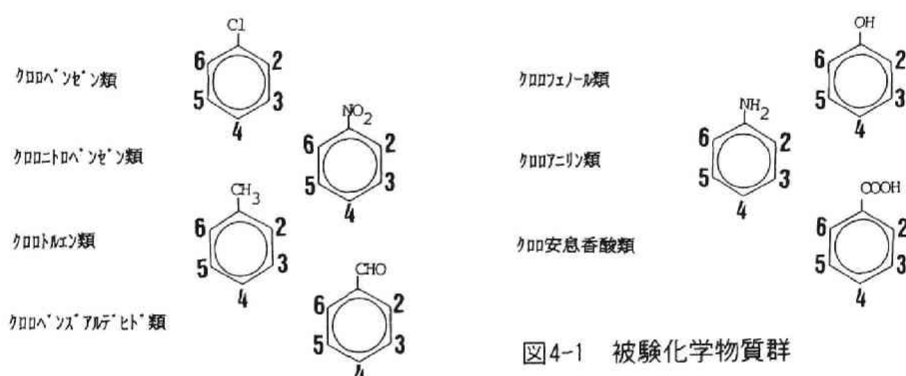


図4-1 被験化学物質群

表4-1 被験化学物質一覧

物質名	入手先	物質名	入手先	物質名	入手先	物質名	入手先
クロベンゼン	和光	2-クロ-4-ニトロフェノール	和光	2-クロ-4-ニトロフェノール	和光	o-クロ安息香酸	和光
o-ジクロベンゼン	和光	2-クロ-5-ニトロフェノール	和光	4-クロ-2-ニトロフェノール	和光	m-クロ安息香酸	和光
m-ジクロベンゼン	和光	4-クロ-3-ニトロフェノール	和光	6-クロ-2,4-ジニトロフェノール	和光	p-クロ安息香酸	和光
p-ジクロベンゼン	和光	5-クロ-2-ニトロフェノール	和光	3-クロ-4-ニトロフェノール	和光	2,3-ジクロ安息香酸	和光
1,2,3-トリクロベンゼン	和光	2,6-ジクロ-4-ニトロフェノール	和光	2,4,5-トリクロベンゼン	和光	2,4-ジクロ安息香酸	和光
1,2,4-トリクロベンゼン	和光	6-クロ-2,4-ジニトロフェノール	和光	2,4,6-トリクロベンゼン	和光	2,5-ジクロ安息香酸	和光
1,3,5-トリクロベンゼン	和光	3-クロ-4-ニトロフェノール	和光	2,3,4-トリクロベンゼン	和光	2,6-ジクロ安息香酸	和光
1,2,3,4-テトラクロベンゼン	和光	4-クロ-2-ニトロフェノール	和光	2,3,5-トリクロベンゼン	和光	3,4-ジクロ安息香酸	和光
1,2,3,5-テトラクロベンゼン	和光	5-クロ-2-ニトロフェノール	和光	2,3,6-トリクロベンゼン	和光	3,5-ジクロ安息香酸	和光
o-クロフェノール	和光	2,6-ジクロ-3-ニトロフェノール	和光	ベンゾクロ安息香酸	和光		
m-クロフェノール	和光	o-クロトルエン	和光	1-クロ-2,4-ジニトロベンゼン	和光		
p-クロフェノール	和光	m-クロトルエン	和光	1-クロ-3,4-ジニトロベンゼン	和光		
2,3-ジクロフェノール	和光	p-クロトルエン	和光				
2,4-ジクロフェノール	東化	2,3-ジクロトルエン	東化				
2,5-ジクロフェノール	東化	2,4-ジクロトルエン	和光				
2,6-ジクロフェノール	和光	2,5-ジクロトルエン	和光				
3,4-ジクロフェノール	和光	2,6-ジクロトルエン	和光				
3,5-ジクロフェノール	和光	3,4-ジクロトルエン	和光				
2,3,4-トリクロフェノール	東化	ベンゾクロトルエン	東化				
2,3,6-トリクロフェノール	東化						
2,4,5-トリクロフェノール	和光						
2,4,6-トリクロフェノール	東化						
2,3,4,5-テトラクロフェノール	東化						
ベンゾクロフェノール	東化						

和光：和光純薬株式会社

東化：東京化成工業株式会社

表4-2に本実験で使用した主な化合物の使用用途を記したが、これらの化学物質は染料、染料の中間体、あるいは農薬、除草剤、殺虫剤、防腐剤等に用いられており、水環境への流出の可能性を包含しているとみなしてよい。

表4-2 芳香族化合物の主な用途

化学物質	用途
クロロベンゼン	染料中間体、医薬、香料
o-ジクロロベンゼン	殺虫剤、消毒剤
m-ジクロロベンゼン	染料中間体、農薬、染料、顔料、医薬などの中間体
p-ジクロロベンゼン	染料中間体、農薬、殺虫剤、防臭剤
1,2,3-トリクロロベンゼン	染料・顔料中間体、トランス油、潤滑剤
1,2,4-トリクロロベンゼン	染料・顔料中間体、トランス油、潤滑剤
1,3,5-トリクロロベンゼン	染料・顔料中間体、トランス油、潤滑剤
o-クロロフェノール	染料中間体、農薬の原料
p-クロロフェノール	染料中間体、殺菌剤
2,4,5-トリクロロフェノール	染料中間体、殺菌剤、防腐剤
2,4,6-トリクロロフェノール	染料中間体、殺菌剤、防腐剤（木材防腐用）
ヘンタクロロフェノール	防腐剤、除草剤、殺菌剤
o-クロロアニリン	染料中間体
p-クロロアニリン	染料中間体
2,5-ジクロロアニリン	染料・顔料中間体
3,4-ジクロロアニリン	染料中間体
o-クロロトルエン	染料、農薬、医薬中間体、中沸点溶剤
p-クロロトルエン	染料、農薬、医薬中間体
ベンゼン	溶剤、燃料
フェノール	染料、溶剤、合成繊維、除草剤、写真材料、香料等製造原料、消毒剤、殺菌剤
ニトロベンゼン	染料中間体
アニリン	靴墨、香料等の製造原料
トルエン	爆薬、染料、香料等の製造原料
安息香酸	防腐剤（食品衛生法で許可された合成保存料の一つ）
ベンズアルデヒド	石鹸香料、香水、芳香剤

2-3 芳香族有機塩素化合物の遺伝毒性の検出

図4-2及び4-3に、被験物質のいくつかの化学物質に対して濃度効果曲線の例を示す。例示したのは1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン、2,4,5-トリクロロフェノール、2,3,4,6-テトラクロロフェノール、ヘンタクロロフェノール、2-クロロ-4-ニトロフェノール及びヘンタクロロトルエンの6化学物質である。横軸には10倍希釈の投与濃度を、縦軸には遺伝毒性強度(A-B)/Bを示している。また図中に陽性を示すライン、(A-B)/B=1を記している。黒丸は+S9mix系を、白丸は-S9mix系である。

いずれも濃度の増加に応じて遺伝毒性強度が増大する濃度効果を表している。陽性を検出できる試験培地中の投与濃度はほぼ10~100mg・L⁻¹となっている。

このようにして得られた濃度効果曲線より、96の各被験物質に関して遺伝毒性を求め、それらを一覧にして表4-3に呈示した。表中には遺伝毒性強度を示した濃度、陽性の判定((A-B)/B 1未満を-、1以上を+、2以上を++)と、()内には

(A-B)/B値を示してある。また併記してRTECS⁽⁵⁾より得られたAmes法における同化学物質の変異原性判定結果を示した。

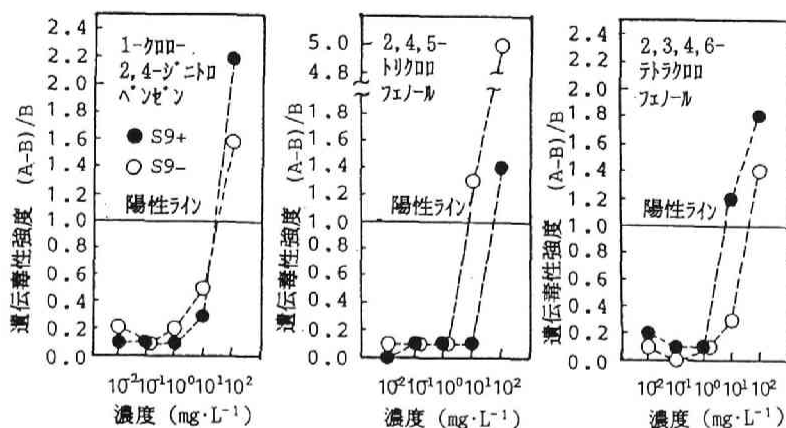


図4-2 濃度効果曲線の例(1)

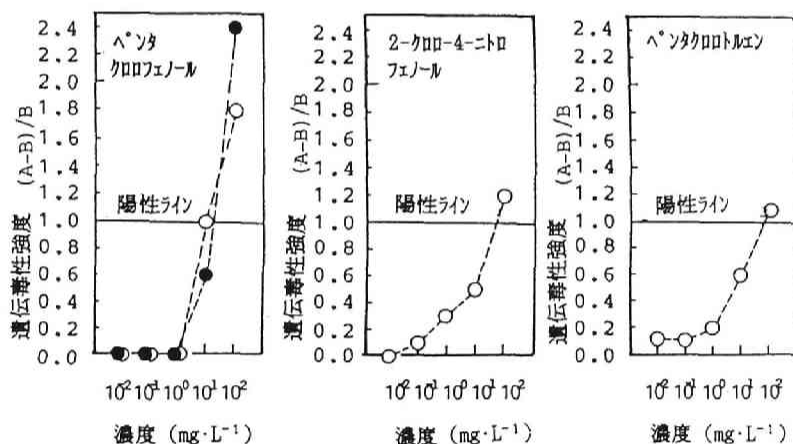


図4-3 濃度効果曲線の例(2)

この表を図化したものが図4-4(1)～(7)である。図には各々の化学物質の遺伝毒性強度(A-B)/Bを棒グラフで示しているが、陽性を示しているものに関してはハッチで表している。

図4-4(1)はクロベンゼン類の遺伝毒性強度を示した。-S9mix系でm-ジクロロ及び1,2,4-トリクロベンゼンに陽性が検出されている。

図4-4(2)はクロフェノール類の結果を示した。比較的多くの化学物質で陽性を検出できた。+S9mix系では、2,3,4-トリ、2,4,5-トリ、2,3,4,6-テトラ及びベンゾクロロフェノールが陽性を示している。一方、-S9mix系では、m-(3-), 2,4-ジ、2,5-ジ、3,4-ジ、3,5-ジ、2,3,4-トリ、2,4,5-トリ、2,4,6-トリ、2,3,4,6-テトラ及びベンゾトリクロロフェノール、さらに2-クロロ-4-ニトロフェノールが陽性を示した。

表4-3 被験化学物質の遺伝毒性

化学物質	濃度 mg・L ⁻¹	+S9	濃度 mg・L ⁻¹	-S9	Ames +S9 -S9
クロロベンゼン類					
クロロベンゼン	100	-(0.08)	100	-(0.00)	
o-ジクロロベンゼン	100	-(0.36)	100	-(0.10)	
m-ジクロロベンゼン	100	-(0.23)	100	+(1.28)	
p-ジクロロベンゼン	100	-(0.07)	100	-(0.00)	
1,2,3-トリクロロベンゼン	100	-(0.41)	100	-(0.00)	
1,2,4-トリクロロベンゼン	100	-(0.13)	100	++(3.32)	
1,3,5-トリクロロベンゼン	100	-(0.00)	100	-(0.00)	
1,2,3,4-テトラクロロベンゼン	100	-(0.03)	100	-(0.23)	
1,2,3,5-テトラクロロベンゼン	100	-(0.18)	100	-(0.30)	
クロロフェノール類					
o-クロロフェノール	100	-(0.00)	100	-(0.00)	
m-クロロフェノール	100	-(0.15)	100	++(3.18)	
p-クロロフェノール	100	-(0.03)	100	-(0.01)	+
2,3-ジクロロフェノール	100	-(0.07)	100	-(0.54)	
2,4-ジクロロフェノール	100	-(0.12)	100	+(1.65)	
2,5-ジクロロフェノール	100	-(0.00)	100	++(2.11)	
2,6-ジクロロフェノール	100	-(0.02)	100	-(0.00)	
3,4-ジクロロフェノール	100	-(0.37)	100	++(5.44)	
3,5-ジクロロフェノール	100	-(0.27)	100	++(3.95)	
2,3,4-トリクロロフェノール	100	++(2.46)	100	++(2.99)	
2,3,6-トリクロロフェノール	100	-(0.33)	100	-(0.63)	
2,4,5-トリクロロフェノール	100	++(2.01)	100	++(5.01)	
2,4,6-トリクロロフェノール	100	-(0.13)	100	+(1.18)	+
2,3,4,6-テトラクロロフェノール	100	+(1.72)	100	+(1.38)	
ペンタクロロフェノール	100	++(2.38)	10	+(1.01)	+
2-クロロ-4-ニトロフェノール	100	-(0.49)	100	+(1.17)	
4-クロロ-2-ニトロフェノール	100	-(0.00)	100	-(0.66)	
クロロニトロベンゼン類					
o-クロロニトロベンゼン	100	-(0.10)	100	-(0.11)	+
m-クロロニトロベンゼン	100	-(0.06)	100	-(0.00)	
p-クロロニトロベンゼン	100	-(0.04)	100	-(0.05)	
2,3-ジクロロニトロベンゼン	100	-(0.12)	100	-(0.16)	
2,5-ジクロロニトロベンゼン	100	-(0.03)	100	-(0.59)	
3,4-ジクロロニトロベンゼン	100	-(0.00)	100	-(0.21)	+
2,3,4-トリクロロニトロベンゼン	100	+(1.09)	100	-(0.39)	+
2,4,5-トリクロロニトロベンゼン	100	++(2.64)	100	-(0.00)	
2,4,6-トリクロロニトロベンゼン	100	-(0.00)	100	-(0.00)	
2,3,5,6-トリクロロニトロベンゼン	100	-(0.00)	100	-(0.02)	
ペンタクロロニトロベンゼン	100	-(0.00)	100	-(0.09)	
1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン	100	+(1.75)	100	+(1.56)	
1-クロロ-3,4-ジニトロベンゼン	100	-(0.29)	100	-(0.86)	
クロロアニリン類					
o-クロロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.55)	
m-クロロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.07)	
p-クロロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.00)	+
2,3-ジクロロアニリン	100	-(0.09)	100	-(0.00)	
2,4-ジクロロアニリン	100	-(0.10)	100	-(0.00)	
2,5-ジクロロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.00)	
2,6-ジクロロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.00)	
3,4-ジクロロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.00)	
3,5-ジクロロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.00)	
2,4,5-トリクロロアニリン	100	+(1.53)	100	+(1.20)	
2,4,6-トリクロロアニリン	100	-(0.06)	100	-(0.00)	
2,3,4,5-テトラクロロアニリン	100	-(0.20)	100	-(0.00)	
2,3,5,6-テトラクロロアニリン	100	-(0.49)	100	-(0.00)	
2-クロロ-4-ニトロアニリン	100	-(0.07)	100	-(0.01)	
2-クロロ-5-ニトロアニリン	100	-(0.39)	100	-(0.29)	
4-クロロ-2-ニトロアニリン	100	-(0.08)	100	-(0.00)	
4-クロロ-3-ニトロアニリン	100	-(0.48)	100	-(0.32)	

5-クロロ-2-ニトロアニリン	100	-(0.49)	100	-(0.61)
2,6-ジクロロ-4-ニトロアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.00)
6-クロロ-2,4-ジニトロアニリン	100	-(0.19)	100	-(0.72)
3-クロロ-4-メチルアニリン	100	-(0.61)	100	-(0.23)
4-クロロ-2-メチルアニリン	100	-(0.12)	100	-(0.06)
5-クロロ-2-メチルアニリン	100	-(0.00)	100	-(0.04)
2,6-ジクロロ-3-メチルアニリン	100	-(0.10)	100	-(0.00)
クロロベンゼン類				
o-クロロベンゼン	100	-(0.81)	100	-(0.53)
m-クロロベンゼン	100	-(0.73)	100	-(0.56)
p-クロロベンゼン	100	-(0.77)	100	-(0.58)
2,3-ジクロロベンゼン	100	-(0.58)	100	-(0.91)
2,4-ジクロロベンゼン	100	-(0.44)	100	++(2.64)
2,6-ジクロロベンゼン	100	-(0.51)	100	++(3.62)
3,4-ジクロロベンゼン	100	-(0.61)	100	++(3.22)
ヘキサクロロベンゼン	100	-(0.04)	100	+(1.04)
2-クロロ-6-ニトロベンゼン	100	-(0.00)	100	-(0.00)
2-クロロ-4-ニトロベンゼン	100	-(0.20)	100	-(0.29)
4-クロロ-2-ニトロベンゼン	100	-(0.14)	100	-(0.17)
クロロ安息香酸類				
o-クロロ安息香酸	100	-(0.00)	100	-(0.00)
m-クロロ安息香酸	100	-(0.06)	100	-(0.01)
p-クロロ安息香酸	100	-(0.20)	100	-(0.17)
2,3-ジクロロ安息香酸	100	-(0.00)	100	-(0.09)
2,4-ジクロロ安息香酸	100	-(0.00)	100	-(0.32)
2,5-ジクロロ安息香酸	100	-(0.00)	100	-(0.00)
2,6-ジクロロ安息香酸	100	-(0.00)	100	-(0.14)
3,4-ジクロロ安息香酸	100	-(0.49)	100	-(0.00)
3,5-ジクロロ安息香酸	100	-(0.27)	100	-(0.00)
2-クロロ-4-ニトロ安息香酸	100	-(0.00)	100	-(0.00)
2-クロロ-5-ニトロ安息香酸	100	-(0.85)	100	-(0.55)
3-クロロ-2-ニトロ安息香酸	100	-(0.29)	100	-(0.00)
4-クロロ-2-ニトロ安息香酸	100	-(0.12)	100	-(0.00)
4-クロロ-3-ニトロ安息香酸	100	-(0.18)	100	-(0.01)
クロロヘキサフルオロベンゼン類				
o-クロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.08)	100	-(0.93)
m-クロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.25)	100	-(0.01)
p-クロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.35)	100	-(0.09)
2,3-ジクロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.12)	100	-(0.18)
2,4-ジクロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.09)	100	-(0.09)
2,6-ジクロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.19)	100	-(0.84)
3,4-ジクロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.16)	100	-(0.00)
3,5-ジクロロヘキサフルオロベンゼン	100	-(0.12)	100	-(0.10)

() は遺伝毒性強度(A-B)/Bを示す



図4-4(1) クロベンゼン類の遺伝毒性

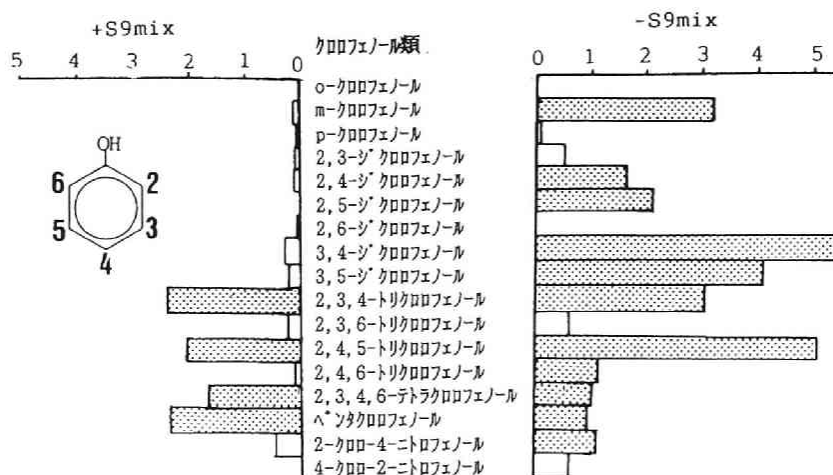


図4-4(2) クロフェノール類の遺伝毒性

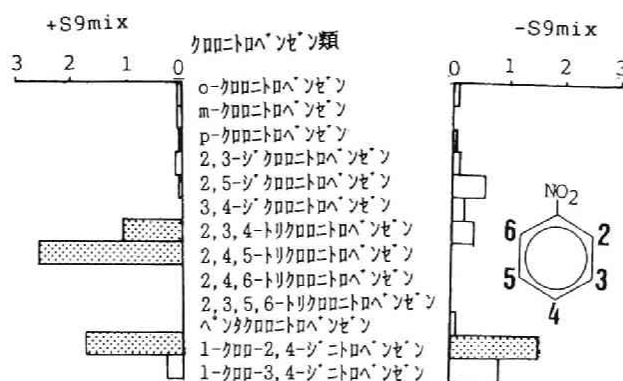


図4-4(3) クロニトロベンゼン類の遺伝毒性

クロニトロベンゼン類の結果を図4-4(3)に示す。+S9mix系で、2,3,4-トリ、2,4,5-トリクロニトロベンゼン及び1-クロ-2,4-ジニトロベンゼンが陽性を示している。-S9mix系では1-クロ-2,4-ジニトロベンゼンのみが陽性を示した。

図4-4(4)にはクロアニリン類の結果を示した。2,4,5-トリクロアニリンがS9mix有無両系で陽性を検出されている。

クロトルエン類の結果を図4-4(5)に示した。-S9mix系のみで2,4-ジ、2,6-ジ、3,4-ジ及びペンタクロトルエンで陽性が示されている。

図4-4(6)(7)にはクロ安息香酸及びクロベンズアルデヒドの結果が各々示されているが、いずれの化学物質も陽性は検出されなかった。

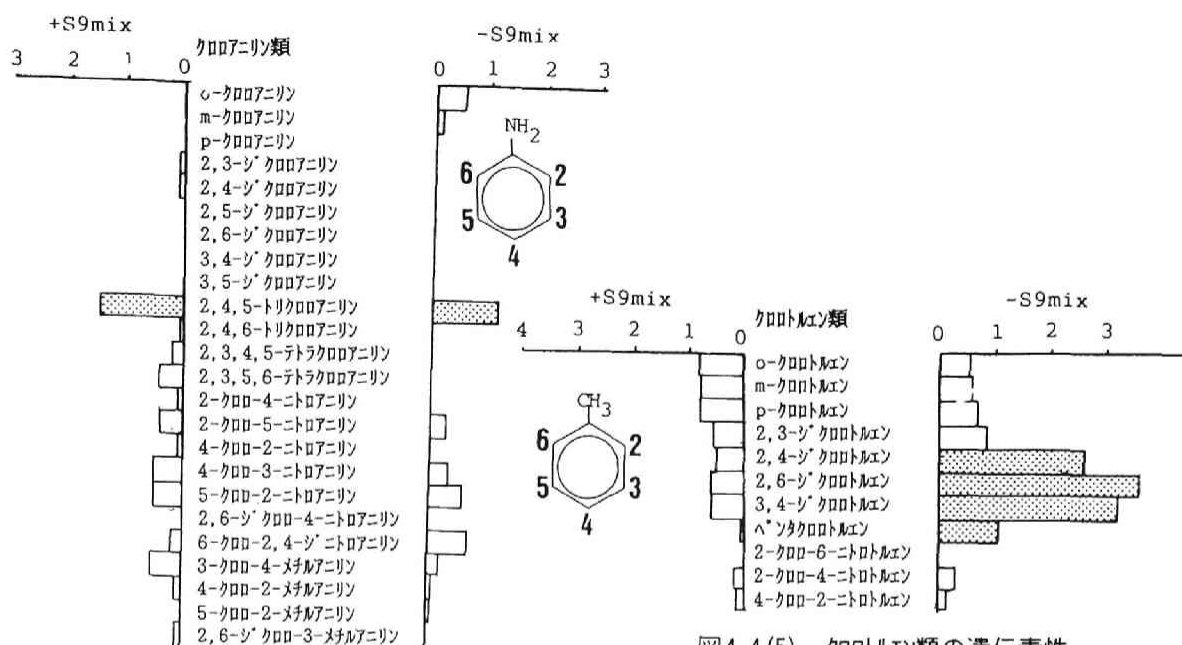


図4-4 (4) クロロアニリン類の遺伝毒性

図4-4 (5) クロロルエン類の遺伝毒性

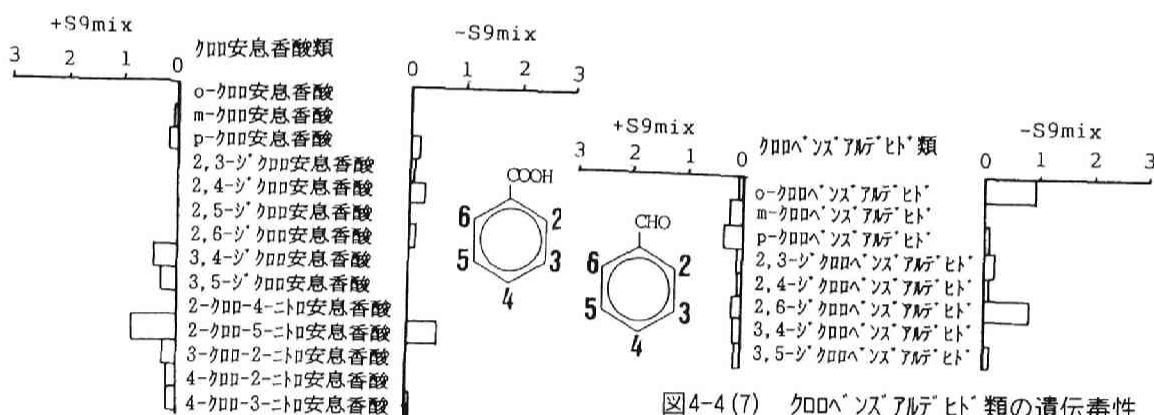


図4-4 (6) クロロ安息香酸類の遺伝毒性

図4-4 (7) クロロベンズアルデヒド類の遺伝毒性

上記の結果を前章で示したような遺伝毒性指数、すなわち遺伝毒性陽性を示す細胞当りの化学物質の投与分子数を表したものを図4-5に示した。図より下方に向かうにしたがい遺伝毒性が強くなることを表している。対象とした化学物質はベンツクロロフェノールを除いてほぼ 10^9 molecules \cdot cell $^{-1}$ の範囲にあり、これは前章で示した化学酸化処理生成物の場合とほぼ同等のオーダーにあることがわかる。図中で塩素置換基の数が增加するほど、遺伝毒性が強くなる傾向にあることがわかる。とくにベンツクロロフェノール(PCP)は、検討した化学物質中でも最も強い遺伝毒性を代謝活性有無の両系で示していた。

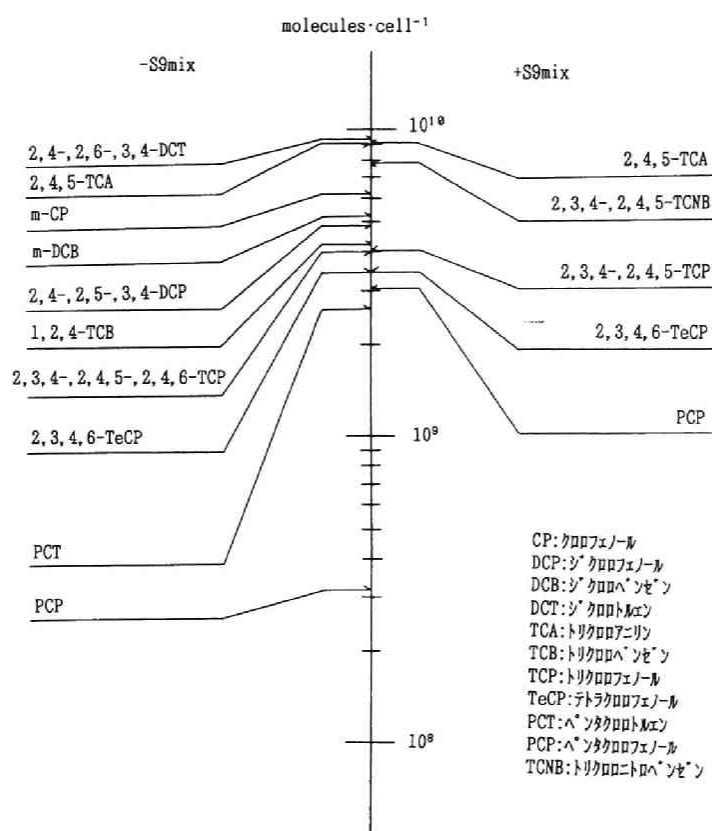


図4-5 遺伝毒性指数

2-4 遺伝毒性と構造因子の相関関係

上述したように96化学物質をumuテストでその遺伝毒性を検討したが、全体を通して4位に塩素置換基を有する化学物質に比較的遺伝毒性が多く検出される傾向にあった。これは4位の塩素基は、特に+S9mixの系でP450酵素系に存在するモノオキシゲナーゼにより、脱塩素され-OH基に置換することが指摘されている¹⁶⁾。-OH基は=O基となる過程で孤立電子を周辺の酸素に与え、 H_2O_2 などの活性酸素を生成する可能性があり、これらがDNAを損傷するという仮説が存在する¹⁷⁾。このことと4位塩素基に遺伝毒性が多い事実は関係していると推察されるが、本実験系では培養細胞を用いているため、細胞膜の透過や細胞質内での酵素反応系など、いくつかのプロセスを経てDNAに付加、あるいは活性酸素の生成を促進すると考えられるので、以下に化学物質の有する固有の構造因子との関係を検討してみることとする。

前項で得られた各化学物質の有する遺伝毒性強度(A-B)/Bと構造因子の単相関係数を求める。

まず被験化学物質に関して、各々の持つ塩素置換基数(Nc)、親水性及び疎水性

の指標となる溶解度 (Ws)、複雑な立体効果を表す融点 (F)、及び電子的効果を表す Hammett の置換基定数 ($\Sigma \sigma$) との相関を調べた。ここでは一連の異性体についての置換基の種類を統一するため、2-クロロ-4-ニトロフェノールなどの誘導体はこの解析から省いている。また、溶解度は、0；不溶、1；難溶、2；微溶、3；可溶、4；溶、5；易溶の6段階に分類した¹⁸⁾。さらに Hammett の置換基定数に関しては、 ρ 位については ρ 位と同じ $\Sigma \sigma$ 値を用いている。各物質の各構造因子の値を表4-4に示した。表中 N はデータが得られていない項目である。

表4-4 各化学物質における遺伝毒性と構造因子

化学物質	遺伝毒性強度		水に対する溶解度	置換塩素基数	融点「℃」	Hammett の置換基定数
	S9+	S9-				
クロロベンゼン	0.1	0	0	1	-45.0	0.000
o-ジクロロベンゼン	0.4	0.1	1	2	-17.0	0.227
m-ジクロロベンゼン	0.2	1.3	1	2	-24.8	0.373
p-ジクロロベンゼン	0.1	0	0	2	54.0	0.227
1,2,3-トリクロロベンゼン	0.4	0.3	0	3	52.6	0.600
1,2,4-トリクロロベンゼン	0.1	3.3	0	3	17.2	0.454
1,3,5-トリクロロベンゼン	0	0	0	3	63.5	0.746
1,2,3,4-テトラクロロベンゼン	0.0	0.2	N	4	46.5	0.827
1,2,3,5-テトラクロロベンゼン	0.2	0.3	N	4	54.5	0.973
o-クロロフェノール	0	0	3	1	9.3	0.227
m-クロロフェノール	0.2	1.0	3	1	32.8	0.373
p-クロロフェノール	0.0	0.0	1	1	43.0	0.227
2,3-ジクロロフェノール	0.1	0.5	N	2	58.0	0.600
2,4-ジクロロフェノール	0.1	1.7	2	2	45.0	0.454
2,5-ジクロロフェノール	0	1.8	N	2	59.0	0.600
2,6-ジクロロフェノール	0.0	0	N	2	69.0	0.454
3,4-ジクロロフェノール	0.4	5.8	N	2	68.0	0.600
3,5-ジクロロフェノール	0.3	4.0	1	2	68.0	0.746
2,3,4-トリクロロフェノール	1.8	1.0	N	3	83.5	0.827
2,3,6-トリクロロフェノール	0.3	0.6	2	3	58.0	0.827
2,4,5-トリクロロフェノール	1.4	1.3	N	3	68.0	0.827
2,4,6-トリクロロフェノール	0.1	1.4	1	3	69.0	0.681
2,3,4,6-テトラクロロフェノール	1.2	1.4	N	4	64.5	1.054
ペンタクロロフェノール	2.4	1.8	0	5	174.0	1.427
o-クロロニトロベンゼン	0.1	0.1	0	1	33.0	0.227
m-クロロニトロベンゼン	0.1	0	0	1	45.0	0.373
p-クロロニトロベンゼン	0.0	0.1	0	1	45.0	0.227
2,3-ジクロロニトロベンゼン	0.1	0.2	0	2	61.0	0.600
2,5-ジクロロニトロベンゼン	0.0	0.6	N	2	55.0	0.600
3,4-ジクロロニトロベンゼン	0	0.2	N	2	43.0	0.600
2,3,4-トリクロロニトロベンゼン	1.1	0.4	N	3	67.5	0.827
2,4,5-トリクロロニトロベンゼン	1.7	0	N	3	96.5	0.827
2,4,6-トリクロロニトロベンゼン	0	0	N	3	N	0.681
2,3,5,6-テトラクロロニトロベンゼン	0	0.0	N	4	N	1.200
ペンタクロロニトロベンゼン	0	0.1	N	5	146.0	1.427

各化学物質における遺伝毒性と構造因子 (つづき)

化学物質	遺伝毒性強度		水に対する溶解度	置換塩素基数	融点「℃」	Hammettの置換基定数
	S9+	S9-				
o-クロロアニリン	0	0.6	N	1	-3.5	0.227
m-クロロアニリン	0	0.1	N	1	-10.4	0.373
p-クロロアニリン	0	0	N	1	70.5	0.227
2,3-ジ'クロロアニリン	0.1	0	N	2	24.0	0.600
2,4-ジ'クロロアニリン	0.1	0	2	2	63.0	0.454
2,5-ジ'クロロアニリン	0	0	1	2	50.0	0.600
2,6-ジ'クロロアニリン	0	0	N	2	39.0	0.454
3,4-ジ'クロロアニリン	0	0	N	2	71.5	0.600
3,5-ジ'クロロアニリン	0	0	N	2	51.0	0.746
2,4,5-トリクロロアニリン	1.6	1.2	2	3	96.0	0.827
2,4,6-トリクロロアニリン	0.1	0	N	3	77.5	0.681
2,3,4,5-テトラクロロアニリン	0.2	0	N	4	118.1	1.200
2,3,5,6-テトラクロロアニリン	0.5	0	N	4	N	1.200
o-クロロトルエン	0.8	0.5	N	1	-36.2	0.227
m-クロロトルエン	0.7	0.6	0	1	-47.8	0.373
p-クロロトルエン	0.8	0.6	0	1	7.2	0.227
2,3-ジ'クロロトルエン	0.6	0.9	N	2	N	0.600
2,4-ジ'クロロトルエン	0.4	2.6	N	2	-13.5	0.454
2,6-ジ'クロロトルエン	0.5	3.7	N	2	N	0.454
3,4-ジ'クロロトルエン	0.6	3.2	N	2	-16.0	0.600
p-ニトロクロロトルエン	0.0	1.1	N	2	N	1.427
o-クロロ安息香酸	0	0	3	1	142.0	0.227
m-クロロ安息香酸	0.1	0.0	3	1	158.0	0.373
p-クロロ安息香酸	0.2	0.2	0	1	243.0	0.227
2,3-ジ'クロロ安息香酸	0	0.1	N	2	168.3	0.600
2,4-ジ'クロロ安息香酸	0	0.3	N	2	164.3	0.454
2,5-ジ'クロロ安息香酸	0	0	1	2	155.0	0.600
2,6-ジ'クロロ安息香酸	0	0.1	N	2	144.0	0.454
3,4-ジ'クロロ安息香酸	0.5	0	2	2	208.5	0.600
3,5-ジ'クロロ安息香酸	0.3	0	1	2	188.0	0.746
o-クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.1	0.9	1	1	11.7	0.227
m-クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.2	0.0	1	1	17.5	0.373
p-クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.4	0.1	1	1	49.0	0.227
2,3-ジ'クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.1	0.2	2	2	66.0	0.600
2,4-ジ'クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.1	0.1	2	2	136.5	0.454
2,6-ジ'クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.2	1.0	2	2	71.0	0.454
3,4-ジ'クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.2	0	2	2	44.0	0.600
3,5-ジ'クロロペン'ンス'アルデ'ヒド'	0.1	0.1	2	2	65.0	0.746

これらの値を基に、各構造因子と遺伝毒性強度の相関分析を行なった。相関分析に適用した母集団は、各異性体毎に解析した。結果を表4-5に示す。表より+S9 mix系において、クロフェノール類(n=15)の示した遺伝毒性強度と、塩素置換基数(R=0.83)、融点(R=0.80)、及びHammett定数(R=0.86)との間に正の相関が比較的高いことが示された。また、クロトルエン類(n=8)の遺伝毒性強度と塩素置換基数(R=-0.96)及びHammett定数(R=-0.92)の間には負の相関が認められた。他の異性体に関しては顕著な相関が得られず、構造因子と遺伝毒性強度との間に関係を見いだすことはできなかった。

表4-5 各構造因子と遺伝毒性の相関係数

化学物質	n	S9	水の溶解性 W_s	塩素置換基数 N_c	融点 F	Hammettの 置換基定数 $\Sigma \sigma$
クロロベンゼン類	9	+	ND	-0.17	-0.22	-0.18
	9		ND	0.11	-0.16	-0.02
クロフェノール類	15	+	-0.62	0.83	0.80	0.86
	15		-0.38	0.14	0.27	0.27
クロロクロベンゼン類	11	+	ND	0.14	0.27	0.12
	11		ND	-0.11	-0.16	-0.08
クロロフェノール類	13	+	ND	0.52	0.21	0.42
	13		ND	0.05	-0.12	-0.02
クロロフェノール類	8	+	ND	-0.96	-0.58	-0.92
	8		ND	0.13	0.15	0.05
クロロ安息香酸類	9	+	-0.20	0.09	0.70	0.33
	9		-0.67	0.08	0.24	-0.29
クロロベンゾアルデヒド類	8	+	ND	-0.47	-0.24	-0.49
	8		ND	-0.17	-0.17	-0.35

そこで比較的高い相関を示したクロフェノール類に対して、塩素基置換基数、溶解度、融点、Hammett定数に加え、茂岡らが実施したクロフェノール類の構造因子と毒性解析に準じて、構造因子として疎水性の指標であるn-オクタノール/水分配係数(logPow)、酸解離定数(pKa)、分子の立体効果の指標である原子価分子結合性指数($^1\chi^v$)、及び分子の有効断面周囲(ΣD)と遺伝毒性強度(A-B)/Bの相関を求めた。ここでは、リン脂質より成る細胞膜への化学物質の透過という観点から、 W_s 、logPow、pKaを採用し、DNAへの損傷という観点より、 N_c 、 F 、 $\Sigma \sigma$ 、 $^1\chi^v$ 及び ΣD を採用した。これらの各因子間には相互に相関性を有するものが多いため、寄与率を算出する分散分析や、それを用いた重回帰分析は実施しがたく、単回帰分析にとどめ各因子と遺伝毒性を独立に相関させた。この結果を+S9mix両系に関し表4-6に示す。

表より、+S9mix系で高い相関を示したのは、化学物質の構造に関わり、分子の結合性に関与していると考えられる指標で、塩素置換基数($R=0.83$)、融点($R=0.83$)、Hammett定数($R=0.84$)、原子価分子結合性指数($R=0.86$)、及び有効断面周囲($R=0.82$)であった。ま

表4-6 クロフェノール類の各構造因子と遺伝毒性強度の相関係数

構造因子	単相関係数	
	+S9mix	-S9mix
塩素置換基数 N_c	0.83(15)	0.22(15)
融点 F	0.83(15)	0.23(15)
Hammettの置換基定数 $\Sigma \sigma$	0.84(15)	0.34(15)
原子価分子結合性定数 $^1\chi^v$	0.86(14)	0.22(14)
分子有効断面周囲 ΣD	0.82(14)	0.27(14)
水の溶解性 W_s	0.29(8)	-0.62(8)
n-オクタノール/水 分配係数 logPow	0.84(14)	0.43(14)
酸解離定数 pKa	-0.74(14)	0.07(14)

()はデータ数を示す

た化学物質の細胞膜透過に関わる指標としてn-オクタノール/水分配係数($R=0.84$)との間にも高い相関が得られた。同表より寄与率からみれば原子価分子結合性指数が最も高く、ついで分配係数とHammett定数が

0.7以上の高い寄与を示していることがわかった。これら因子との単回帰式を表4-7に示した。

以上の相関係数についてのまとめを図4-6に示す。このように、クロフェノール類に関する遺伝毒性、すなわちDNAの損傷は、第一に化学物質の立体構造、ついで化学物質の細胞膜透過を表す脂溶性、置換基の配置による電子的効果、そして置換基の数の順に影響を受けていることがわかった。

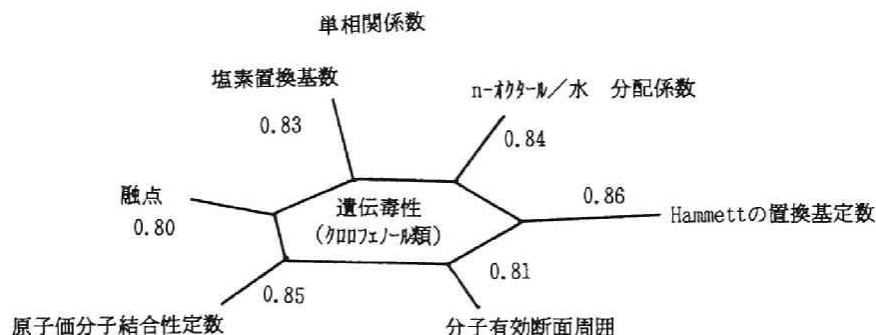


図4-6 クロフェノールの構造相関

茂岡らはミジンコ(*Daphnia magna*, *D. carinata*, *D. pulex*)に対して構造相関分析を実施し、その EC_{50} と比較した¹³⁾。いずれの種も分配係数 $\log P_{ow}$ との相関が高く、ついでHammett定数、原子価分子結合性指数、そして有効断面周囲の順に高く、化学物質の疎水性が最も寄与していると判断している。これは細胞毒性を指標としているため、とくに細胞膜透過性との相関が高くなったと考えることができるが、本研究においては遺伝毒性、即ちDNAの損傷性を検討したため、DNAとの結合に関わるような化学物質の立体構造の相関性が高くなったと考えられる。以上のような解析を通して、化学物質の構造因子を検討することで、その誘発されるとみなされる遺伝毒性をある程度推測することが可能となった。

2-5 まとめ

芳香族有機塩素化合物クロベンゼン、クロフェノール、クロニトロベンゼン、クロアニリン、クロトルエン、クロ安息香酸、クロアルデヒドの有する遺伝毒性強度と、それらの構造因子間の相関をとることにより誘発する遺伝毒性が、どのような因子に支配されているかを

検討した。

①遺伝毒性陽性であった化学物質は次の通りである。

クロロベンゼン類: -S9mix m-ジクロロ及び1, 2, 4-トリクロロベンゼン

クロフェノール類: +S9mix 2, 3, 4-トリ、2, 4, 5-トリ、2, 3, 4, 6-テトラ、ヘンタクロフェノール
-S9mix m-(3-), 2, 4-ジ、2, 5-ジ、3, 4-ジ、3, 5-ジ、2, 3, 4-トリ、
2, 4, 5-トリ、2, 4, 6-トリ、2, 3, 4, 6-テトラ、ヘンタクロフェノール、
2-クロロ-4-ニトロフェノール

クロニトロベンゼン類: +S9mix 2, 3, 4-トリ、2, 4, 5-トリクロロニトロベンゼン、
1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン
-S9mix 1-クロロ-2, 4-ジニトロベンゼン

クロアニリン類: +S9mix 2, 4, 5-トリクロロアニリン
-S9mix 2, 4, 5-トリクロロアニリン

クロトルエン類: -S9mix 2, 4-ジ、2, 6-ジ、3, 4-ジ、ヘンタクロトルエン

以上の結果から、遺伝毒性指数を算出すると塩素置換基の数の増加にともない遺伝毒性が増加する傾向にあり、特にヘンタクロフェノールは+S9mix系で、最も遺伝毒性が強く検出された。また傾向として、4位に塩素置換基を有するものに比較的遺伝毒性を誘発する化学物質が多かった。

②化学物質の遺伝毒性と、塩素置換基数(Nc)、親水性及び疎水性の指標となる溶解度(Ws)、複雑な立体効果を表す融点(F)、及び電子的効果を表すHammettの置換基定数($\Sigma\sigma$)の間の相関を調べた。その結果、クロフェノールにこれら構造因子との比較的強い相関性がみられた。

③クロフェノール類に対して、塩素基置換基数、溶解度、融点、Hammett定数に加え、疎水性の指標であるn-オクタノール/水分配係数(logPow)、酸解離定数(pKa)、分子の立体効果の指標である原子価分子結合性指数($^1\chi^v$)、及び分子の有効断面周囲(ΣD)と遺伝毒性強度(A-B)/Bの相関を求めた。その結果、クロフェノール類の遺伝毒性強度は、細胞膜透過に係わるlogPow、及びDNAの結合に関与していると考えられるNc、F、 $\Sigma\sigma$ 、 $^1\chi^v$ 及び ΣD に高い相関性を示した。とくにDNAの損傷に関わるような化学物質の立体構造に関する因子が高い寄与率を有していた。

第3節 umuテストへの標的論の適用と化学物質のリスク評価

3-1 標的論の概説

標的論は放射線生物学の分野で、放射線により細胞が致死する現象を、生理学的理解やDNAの分子生物学的解析ではなく、細胞中に放射線が照射されると生存に困難な機構が働くとした物理学的でかつ統計学的な理論である。放射線の場合には、細胞致死の現象に際してこの理論がよく適合していることが知られている(19, 20)。

放射線や、あるいはここでは化学物質のようなDNAに損傷を与える物質が細胞に投与された場合、生起する損傷をヒットと呼び、DNAのような生存に係わる細胞内器官に標的(target)が存在するとする。平均qのヒットが生じる確率的試行において実際にx回ヒットが生じる確率分布はポアソン分布にしたがう。

$$p(x) = e^{-q} (q^x / x!) \quad (x=0, 1, 2, \dots)$$

ここで細胞は標的を1個しか持たず、標的は1ヒットで機能を損傷されると仮定するone-hit one-target theoryによれば、生存率Sでヒットを全くうけない場合は、

$$p(x) = S = e^{-q}$$

平均1個のヒットが標的に生じるのは $q=1$ 、つまり $S=e^{-1}=0.37$ となる。このことは生存率37%のときに平均1個の致死ヒットが生じていることを表している。

さて細胞内にはDNAの他、致死のためにはいくつかの器官の損傷が予想される。またDNAにおいても損傷に対しては修復機構が働き、致死するためにはある程度の損傷が必要となることが考えられる。そこで細胞内に標的が m 個あり、それぞれは1ヒットで不活性化されるが、 m 標的がすべて不活性化されたときに細胞は初めて死ぬと仮定する。これはOne-hit multi-target modelと呼ばれている。ある標的に平均 q 個の致死ヒットが生じているとする。ある標的が実際に死んでいく確率は $(1-e^{-q})$ となる。したがって m 個の標的がすべて死ぬ確率は $(1-e^{-q})^m$ となる。

$$\text{生存率 } S = 1 - (1 - e^{-kD})^m \quad (q=kD)$$

ここで k :不活性化断面積 $=D_0^{-1}$ 、 D :線量、 D_0 :不活性化線量(37%生存量を与える量)、 m :外挿数(標的の数)

これを概念図で示すと、図4-7のようになる。横軸は投与濃度 D で、縦軸は生存率 S である。得られたdose-responseが直線となる場合、この傾きが $k=D_0^{-1}$ であり、直線の外挿値が外挿数となる。

化学物質の遺伝毒性や発癌性に関する定量的なリスク評価ではこのようなモデルとして汎用されるのは、このOne-hit modelや、S字カーブ型のデータに対するWeibull model、さらにGamma multi-hit model、Armitage-doll multi stage modelなどを適用することが推奨されているが²¹⁾、毒性学的判断から厳しい評価が必要と思われる物質についてはOne-hit modelのような低用量域では直線性を示すモデルを適用することが望ましいとされる。そこで本節では第2章第3節で示したモデル化学物質をumuテストに与え、その増殖阻害性とumuDC遺伝子の誘発の経時変化を追跡したデータを基にOne-hit modelを適用し、そのリスク評価を試みた。

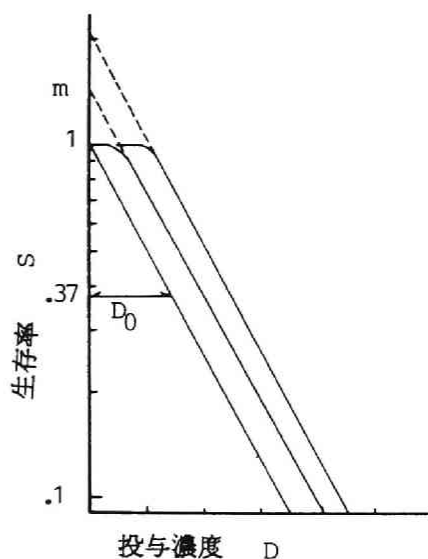


図4-7 One-hit modelの概念図

3-2 One-hit modelの適用

まず第1にOD_{50%}の増殖曲線より、溶媒対照に対するプロモルム、クロルム、m-ジクロ

ロベンゼン、ホルムアルデヒド、グリオキサール、m-クロロフェノールをモデル化学物質として、各々の投与濃度の致死性を検討した。溶媒対照の増殖曲線のある培養時間における OD_{600} の値を1.0として、その時間に対応する各投与濃度の増殖曲線上の値を算出し、片対数紙上にプロットした。この例をブロホム、クロホム、m-ジクロベンゼン、ホルムアルデヒドに関して図4-8に示す。図より切片の値が外挿値すなわち標的数 m 、傾きが k であり、この逆数が不活性化濃度 D_0 となる。これらの値は試験菌株が増殖阻害を起こすにいたる細胞障害（化学的ストレス）及びDNA損傷のための、投与化学物質の標的数、及びその不活性化濃度を算出している。

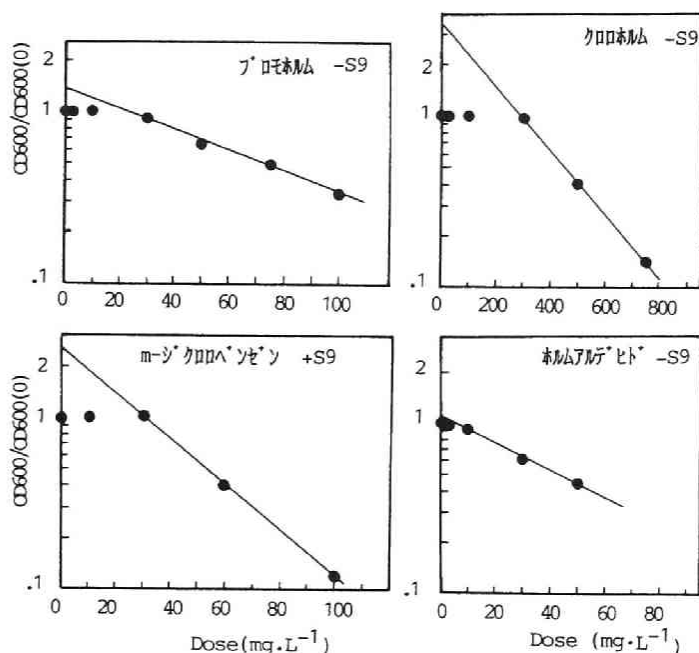


図4-8 OD_{600} に対するモデル適用例

次に β -galactosidaseのデータより、それがDNA損傷にともなって誘発されてくる μ muDC遺伝子量を表す指標であることより、各投与化学物質のDNA損傷に関わる標的数及び不活性化濃度を算出した。これは各投与濃度における β -galactosidaseの最大誘発活性量を、溶媒対照における最大誘発量で除し、その逆数を片対数紙上にプロットして求めた。その例をブロホム、クロホム、m-ジクロベンゼン、ホルムアルデヒドに関して図

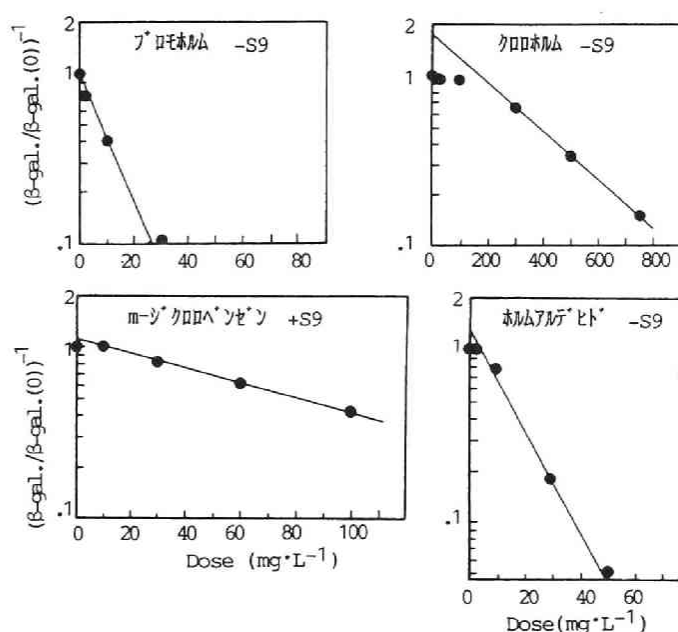


図4-9 μ muDC遺伝子に対するモデル適用例

4-9に示す。

これらの計算を先に示したデータに関して、各モデル化学物質の-S9mix系と+S9mix系双方について算出した結果を表4-8にまとめて示した。表中増殖阻害を生起するに至る細胞中の標的数が多いものでクロロム+S9mix系の3.5や、m-ジクロロベンゼンの2.55、m-クロロフェノールの10がある。これらは前章でみたように再増殖するまでに時間を要する化学物質で、そのことは標的数の多さとして表されているといえる。他は1から2の間にあり、大きな増殖阻害性を有していない物質群である。不活性化濃度 D_0 は、投与した化学物質により試験菌株の細胞が増殖阻害を示す濃度を表している。つまりこの値が小さいほど少ない投与濃度で増殖阻害を呈することがいえる。この点からみてもm-ジクロロベンゼン及びm-クロロフェノールは増殖阻害性の比較的高い化学物質であることがわかる。

表4-8 不活性化濃度

モデル化学物質	S 9 添加	OD ₅₅₀ base		β -galactosidase base		
		m	D_0 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	m	D_0 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	D_0' ($\text{molecular} \cdot \text{cell}^{-1}$)
プロモホルム		1.37	74.5	1.00	11.1	8.07×10^8
	+	1.25	54.4	1.09	32.3	3.33×10^9
クロロホルム		3.50	233	1.80	301	4.65×10^{10}
	+	1.60	586	1.00	196	4.42×10^{10}
m-ジクロロベンゼン		1.12	16.4	1.52	22.5	2.81×10^9
	+	2.55	32.9	1.10	104	1.84×10^{10}
ホルムアルデヒド	-	1.11	54.0	1.40	14.6	6.70×10^9
	+	1.25	59.0	1.80	9.6	8.34×10^9
グリオキサール		1.00	87.8	1.00	92.7	2.20×10^{10}
	+	1.14	598	1.00	83.1	3.74×10^{10}
m-クロロフェノール	-	10	12.3	1.30	47.1	1.05×10^{10}
	+		-		-	

β -galactosidaseに関するデータにより求められた標的数はDNA損傷の各化学物質の細胞における標的数を予測したものになるが、この表より各化学物質とも1から2の間にある。これは試験菌*Salmonella typhi*の有するDNAの塩基対数が大腸菌のそれから推定しても高々 10^6 程度²²⁾であることや、DNA損傷の一つの形態であるDNA付加体の検出が、芳香族アミンで 10^7 塩基対に1個、4NQOで $3/10^6$ 、DMABで $5/10^7$ の検出が可能であるとの報告²³⁾より、この推定した標的の数はこのオーダーであるとしてもよいと考える。ただしこれは、umuDCが誘発されるに及ぶ標的数のことで、化学物質により損傷が増えれば、dose responseをみてもわかるようにほぼ比例的にumuDC遺伝子の誘発は増加していくことが考えられる。

また不活性化濃度は β -galactosidaseが検出できた投与濃度を表している。この濃度もあくまでこのlacZをコードした融合遺伝子による検出法での不活性化濃度

であり、実際にDNA損傷に閾値は存在せず、少量でもumuDC遺伝子は誘発されていると考えられる。

3-3 遺伝毒性リスク評価の検討

発癌性物質に閾値は存在しないという定義をとると、分析限界以下の発癌性物質を含む飲料水は、その物質を含まない飲料水とは化学的に全く区別がつかないのに、安全とはいえないことになる。VSD (virtually safe dose, 実質安全用量) の考え方はこの矛盾の解決のために導入されたもので、用量Dによって起こされる生涯リスクが、ある極めて低い危険率よりも小さいならば実質的に安全である、というものである²⁴⁾。

合衆国環境保護庁(U.S.EPA)のHealth Advisories(HA)によれば、飲料水中の化学物質による発癌の危険率の算定は以下の式で導かれる²⁵⁾。

$$\text{飲料水中のVSD} = \frac{(10^{-x})(70\text{kg})}{(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})(q_1^*)(2\text{L}\cdot\text{day}^{-1})} \quad (1)$$

ここで 10^{-x} : 危険率(発癌率) $x=4, 5, \text{ or } 6$ (生涯発癌が1万人に1人、10万人に1人、100万人に1人という超過危険率をもたらす)
 70kg : 成人の体重
 q_1^* : 線形多段階モデルによって算定したヒトの発癌係数
 $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1})^{-1}$
 $2\text{L}\cdot\text{day}^{-1}$: 成人の水の摂取量

本式にしたがってモデル化学物質の示したOne-hit multi-target modelより得られた不活性化濃度 D_0 を用いて、各化学物質の有する遺伝毒性リスクの評価を試みる。umuテストには、lacZによるコトと吸光度による測定という検出上の感度が存在するため、みかけ上陽性閾値が存在するものの、実際には低用量でもumuDC遺伝子は誘発すると考えられる。ある極めて低い危険率、即ち遺伝毒性の試験の結果を低用量に直線で外挿し、無視できる確率として、FDA(Food & Drug Agency)の採用している 10^{-6} 、つまり100万人に1人という値²⁴⁾をここでも使用する。

そこでumuテストを基に誤りがちの修復遺伝子umuDCが誘発されて遺伝毒性を示す生涯許容濃度として、以下にVSDを定義した。

$$\text{飲料水中のVSD} = \frac{(10^{-6})(\text{ヒト体細胞数}(\text{cells}))}{(\text{molecules}\cdot\text{L}^{-1})k'(2\cdot365\cdot70\text{L})} \quad (2)$$

$k'=D_0^{-1}$; One-hit multi-target modelから算出する
 遺伝毒性係数 $(\text{molecules}\cdot\text{cell}^{-1})^{-1}$

ここで70年間成人一日2Lの飲料水を摂取するとした。HAに示されたような実験動物とヒト体重の換算は、投与量が動物の細胞当りの μg で表された場合にはヒトについても同様に体重当りで考える、という経験上の考え方である²⁶⁾。この体重は細胞数と比例関係にあり、従って D_0 を $\text{molecules}\cdot\text{cell}^{-1}$ と遺伝毒性指数表示にした。

つまり1細胞に対して遺伝毒性作用があれば対象とする器官の細胞数が多ければ、遺伝毒性を示す細胞の発生する確率は増加することとなる。これにより遺伝毒性指数による化学物質の陽性判定の整理が、このリスク評価に応用できることとなる。 D_0' ($\text{molecules} \cdot \text{cell}^{-1}$)は表4-8に併記した。表中の値は $10^8 \sim 10^{10} \text{ molecules} \cdot \text{cell}^{-1}$ であり、従来示してきた陽性閾値の値とほぼ同等のオーダーにある。

さてumuテストで得たデータは細菌細胞のDNA損傷に基づく。DNAの塩基対ではヒトと構造は変わらないが、1細胞中のDNA塩基対数は大腸菌で 3.4×10^6 、ヒト肝細胞で 2.38×10^9 であることが知られている²²⁾。そこで上式は次のように書き換えられる。

ヒト1細胞に対するVSD(1) ($\text{molecules} \cdot \text{L}^{-1}$) =

$$\frac{(10^{-6}) (1 \text{ cell(h)}) (2.38 \times 10^9 (\text{bases/cell(h)})) / (3.4 \times 10^6 (\text{bases/cell(b)}))}{D_0'^{-1} (\text{molecules} \cdot \text{cell(b)}^{-1})^{-1} (2.365 \cdot 70 \text{ L})} \quad (3)$$

cell(h); human cell cell(b); bacterial cell

(3)式より、ある水中に存在する化学物質を70年間摂取し続けたときに1細胞当りに 10^{-6} の確率で遺伝毒性が生起する実質用量が算出される。(3)式に対象とする臓器の細胞数を乗じれば、その対象臓器に対する実質安全用量VSDが算出される。

$$\text{ある臓器への実質安全用量} = \text{VSD(1)} \times (\text{臓器細胞数 cells}) \quad (4)$$

VSD ($\text{molecules} \cdot \text{L}^{-1}$)

たとえばヒト肝細胞は約 2.5×10^{11} cellsあるとされるが、肝細胞に対するVSD(L)を算出する場合には、VSD(1)を 2.5×10^{11} 倍すればよい。

ところで(1)式のHA呈示式においては、この臓器細胞数の項が成人ヒトの体重となっている。これは実験動物で誘発した癌が、ヒトの全ての細胞で起こりうる可能性を表しているものといえようが、実際は臓器により突然変異や発癌は特異性があるのが通常と考えられる。その点では(4)式のように1細胞での遺伝毒性生起の濃度に特定臓器細胞数を乗じて算出する方が、実際により即していると考えられる。ちなみにヒト全細胞数は約 6×10^{13} cellsとされる。

この(3)(4)式にしたがって表4-8の D_0' を用い、各モデル物質の肝細胞VSD(L)及び全細胞VSD(T)について試算したものが表4-9である。表中には $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示も併記した。表より既往のデータと比較のため、VSD(T)をみると、+S9mix系で小数点以下1桁から以上1桁の範囲にあることがわかる。

HAPプログラムにおいて扱われた化学物質中有機塩素化合物について、その発癌性のVSDを表4-10に示す。表中の値は70kgの成人、一日2Lを70年間摂取したときの 10^{-6} の発癌VSDである²⁷⁾。本論と共通するのはm-ジクロロベンゼンで、この発癌性のVSDは、雄ラットを使い、線形多段階モデルを用いた発癌係数より算出した $1.8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ である。この値は本論で試算した遺伝毒性の生涯VSD(T) $3.69 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ とオーダーで一致している。またそのほかの有機塩素化合物のVSDも小数点以下1桁から以上1桁であり、本論の値とその範囲はほぼ一致すると考えられる。

表4-9 遺伝毒性の実質安全濃度試算例 | 2L・day⁻¹ 70年間 10⁻⁶

化学物質	S 9 添加	肝細胞VSD(L)		全細胞VSD(T)	
		molecules・L ⁻¹	μg・L ⁻¹	molecules・L ⁻¹	μg・L ⁻¹
ブロモホルム	-	2.78 x10 ¹²	0.00116	6.67 x10 ¹⁴	0.28
	+	1.14 x10 ¹³	0.00479	2.74 x10 ¹⁵	1.15
クロロホルム	-	1.59 x10 ¹⁴	0.0314	3.82 x10 ¹⁶	7.55
	+	1.51 x10 ¹⁴	0.0298	3.63 x10 ¹⁶	7.18
m-ジクロロベンゼン	-	9.63 x10 ¹²	0.00235	2.31 x10 ¹⁵	0.564
	+	6.30 x10 ¹³	0.0154	1.51 x10 ¹⁵	3.69
ホルムアルデヒド	-	2.30 x10 ¹³	0.00115	5.51 x10 ¹⁵	0.275
	+	2.85 x10 ¹³	0.00142	6.84 x10 ¹⁵	0.341
グリオキサール	-	7.53 x10 ¹³	0.00725	1.81 x10 ¹⁶	1.74
	+	1.28 x10 ¹⁴	0.0123	3.07 x10 ¹⁶	2.96
m-クロロフェノール	-	3.60 x10 ¹³	0.00768	8.64 x10 ¹⁵	1.84
	+	-	-	-	-

表4-10 発癌の実質安全濃度 |(U.S. EPA HA) 70kg 70年間 2L・day⁻¹ 10⁻⁶

化学物質	VSD μg・L ⁻¹
m-ジクロロベンゼン	1.8
四塩化炭素	0.3
クロロベンゼン	発癌性検出できず
ペンタクロロフェノール	データ少ない
テトラクロロエチレン	3.5 (National Academy Science) 0.7 (Cancer Assessing Group in EPA)
トリクロロエチレン	2.8

この値は、たとえば日本人(約10⁸人)を例にとれば、ある物質のVSD以上の濃度によって10⁻⁶の生涯リスクが増えるということは、10⁸×10⁻⁶×70⁻¹ = 1.5 (70年) で1年間に1.5人の反応が新たに加わることを意味している²⁴⁾。ただしこのVSDには、データの性格及び良否によって不確実係数が適用される。この係数選択は主として科学的判断と種内及び異種間の差異、有害作用の重要度、薬物動態学的要因、相殺効果が考慮される要因であるが、ヒトの発癌物質である可能性のあるものについては、EPAは生涯値を算出するときに10倍の不確実係数を追加適用している²⁵⁾。

いずれにせよVSDに関しては、本論中で試算した値は、EPAにおける発癌性試験で得られているデータと同様の値が得られることから、umuテストによる遺伝毒性試験と、それによるOne-hit modelでの定量的リスク評価が化学物質の安全性の評価法として適用可能であることが示唆された。

3-4 まとめ

本節で得られた結果を以下にまとめる。

- ①定量的リスク評価を実施するため、標的論のOne-hit multi-target modelをモデル化学物質ブフェニル、クロルル、m-ジクロベンゼン、ホルムアルデヒド、グリオキサール、m-クロフェノールのumuテスト結果に適用した。
- ②飲料水中の実質安全容量VSDの試算のために、 10^{-6} の危険率で試算した。1日2Lの飲料水を70kgの成人が生涯70年間摂取するとき、遺伝毒性の生起する用量は各モデル物質で $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ で小数点以下1桁から以上1桁の範囲にあることが試算できた。これはU.S.EPA Health Advisoriesにおける有機塩素化合物の発癌性に関する生涯実質安全用量とオーダーで一致しており、umuテストとOne-hit modelによる試算がリスク評価に適用可能であると考えられる。

第4節 結語

本章では化学物質の遺伝毒性評価を、第1にその有する構造因子により推定することを試みた。次に確率モデルを適用し、飲料水中のリスク評価を実施している。以下に得られた成果をまとめる。

- ①芳香族有機塩素化合物クロベンゼン、クロフェノール、クロロベンゼン、クロアニリン、クロトルレン、クロ安息香酸、クロアルデヒドの有する遺伝毒性強度と、それらの構造因子間の相関をとることにより誘発する遺伝毒性が、どのような因子に支配されているかを検討した。

そこで遺伝毒性と、塩素置換基数(Nc)、親水性及び疎水性の指標となる溶解度(Ws)、複雑な立体効果を表す融点(F)、及び電子的効果を表すHammettの置換基定数($\Sigma\sigma$)の間の相関を調べた。その結果、クロフェノールにこれら構造因子との比較的強い相関性がみられた。

- ②クロフェノール類に対して、上記構造因子に加え、疎水性の指標であるn-オクタノール/水分配係数(logPow)、酸解離定数(pKa)、分子の立体効果の指標である原子価分子結合性指数($^1\chi^v$)、及び分子の有効断面周囲(ΣD)と遺伝毒性強度(A-B)/Bの相関を求めた。その結果、クロフェノール類の遺伝毒性強度は、細胞膜透過に係わるlogPow、及びDNAの結合に関与していると考えられるNc、F、 $\Sigma\sigma$ 、 $^1\chi^v$ 及び ΣD に高い相関性を示した。とくにDNAの損傷に関わるような化学物質の立体構造に関する因子が高い寄与率を有していた。これらの解析により、上記異性体の遺伝毒性をその構造より推定することが可能となったと考えられる。

- ③モデル化学物質群に対し、それらの有する遺伝毒性が無閾値反応であるとして、

その飲料水中における実質安全用量を評価しようと試みた。ブフェニル、クロルム、m-ジクロロベンゼン、ホルムアルデヒド、グリオキサール、m-クロロフェノールのumuテスト結果に対し、確率モデルとしてOne-hit multi-target modelを適用し、その適合性を確かめた。

④実質安全容量VSDの試算のために、 10^{-6} の危険率で試算した。そして1細胞当りの実質安全用量式を呈示した。この式を用い、1日2Lの飲料水を成人が生涯70年間摂取するとき、全細胞で遺伝毒性の生起する用量は、各モデル物質で $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ で小数点以下1桁から以上1桁の範囲にあることが試算できた。これはUS EPA Health Advisoriesにおける有機塩素化合物の発癌性に関する生涯実質安全用量とオーダーで一致しており、umuテストとOne-hit modelによる試算がリスク評価に適用可能であると考えられた。

- 1) 柳田友道 (1981); 化学的ストレスに対する反応、微生物科学 2、学会出版センター、405-466
- 2) 鎌滝哲也ら (1990); 升加-MP-450による変異・癌原物質の活性化、環境変異原研究、12(3)、275-281
- 3) F. P. Guengerich (1992); Bioactivation of Pro-mutagens by Oxidation and Glutathione Conjugation、環境変異原研究、14(1)、9-24
- 4) 多田万理子ら (1990); 変異・病原性物質によるDNA損傷と修復: DNA付加体の解析、環境変異原研究、12(3)、241-253
- 5) 二木鋭雄 (1990); 毒性発現におけるフリーラジカルと活性酸素、環境変異原研究、12(3)、255-263
- 6) 川西正祐、井上純子 (1988); 重金属と過酸化水素によるヒト・マウスラジカル生成及びDNA損傷、活性酸素、共立出版、186-191
- 7) 祖父尼俊雄、石館基 (1988); 変異原性と活性酸素、活性酸素、共立出版、178-185
- 8) Shahin, M.M., Rouers, D., Bugaut, A. and Kalopissis, G. (1980); Structure-activity relationships within a series of 2,4-diaminoalkoxybenzene compounds. Mutation Research, 79, 289-306.
- 9) Shahin, M.M., Bugaut, A. and Kalopissis, G. (1980); Structure-activity relationships within a series of m-dismonobenzene derivatives, Mutation Research, 78, 25-31.
- 10) Shahin, M.M. (1987); Relationships between structure and mutagenic activity of environmental chemicals, Mutation Research, 181, 243-256.
- 11) Claxton, L.D. et. al. (1987); Comparative mutagenicity of halogenated pyridines in the Salmonella typhimurium/mammalian microsome, Mutation Research, 176, 185-198
- 12) Birkholtz, D.A., Coutts, R.T., Hruddy, S.E., Danell, R.W. and Lockhart, W.L. (1990); Aquatic toxicology of alkyl-quinolines, Water Research, 24(1), 67-73.
- 13) 茂岡忠義ら (1988); クロコフェノール類の活性汚泥微生物に対する増殖阻害性とその構

造及び微生物による分解との関連、衛生化学、34(3)、266-273

14) 茂岡忠義ら(1988);クロフェノール類のヒダカへの急性毒性と胚の分化阻害性及び構造との相関、衛生化学、34(4)、343-349

15) Edited by Tatken, R. L. and Lewis, R. J. Sr (1981-1982), Lewis, R. J. Sr. and Sweet, D. V. (1983-1984), Registry of toxic effects of chemical substances, U.S. Dept. of health and Human services, national Institute for Occupational Safety and Health.

16) Kiyohara, H. et. al. (1992); Isolation of *Pseudomonas pickettii* strains that degrade 2,4,6-trichlorophenol and their dechlorination of chlorophenols, App. Env. Microbiology, 58(4), 1276-1283

17) 内藤、小野、宗宮、井上、山本、川西(1992);有機塩素化合物によるDNA損傷(その1)ペンタクロフェノール、環境科学会投稿中

18) 化学便覧 基礎編(1975);日本化学会編

19) 近藤宗平(1975);分子放射線生物学、東大出版会、63-72

20) 武部啓(1987);DNA損傷、東大出版会、11-15

21) 内山充(1990);定量的リスクアセスメントの手法、p27

22) 生物学データブック(1986);丸善、p18

23) 多田万里子ら(1990);変異・癌原性物質によるDNA損傷と修復:DNA付加体の解析、環境変異原研究、12(3)、241-253

24) 内山充(1990);定量的リスクアセスメントの手法、p4

25) 米国環境保護庁編、水質問題研究会訳(1987);飲料水中の各種化学物質の健康影響評価、日本水道協会、序論

26) 内山充(1990);定量的リスクアセスメントの手法、p25

27) 米国環境保護庁編、水質問題研究会訳(1987);飲料水中の各種化学物質の健康影響評価、日本水道協会、73-86, 101-112, 150-165, 407-416, 444-456, 489-497

28) Ono, Y., Somiya, I. & Kawaguchi, T. (1992); Genotoxic evaluation on aromatic organochlorine compounds by using umu test, Water Science & Technology, 26(1), 61-69

第5章 水環境へ流入する生活起因有機物質の遺伝毒性評価

第1節 概論

水環境中に存在し、その発癌性が懸念されるトリクロロエチレン、テトラクロロエチレンさらに近年、農薬、除草剤などの非点源汚染として注目されつつある物質は以下のようにその毒性が検討されている。溶剤であるテトラクロロエチレン(PCE)は、ドライクリーニングの工程、金属の脱脂用、繊維工業などに使用される合成化学物質で¹⁾、トリクロロエチレン(TCE)は、溶媒及び金属部品の脱脂剤に用いられ肝ミクロソーム系で *Salmonella typhi* に変異原性が認められている²⁾。ペンタクロロフェノール(PCP)は、木材防腐剤、除草剤、殺菌剤、防虫剤として用いられてきた。PCPの変異原性はAmesテストでは陰性、*Saccharomyces cerevisiae*においては陽性を示している。また *Bacillus subtilis*/rec-assay、マウススポット試験、培養ヒトリハダ球において陽性とされている。発癌性に関してはマウスとラットで評価され、いずれも発癌性は検出されていない³⁾。

ところで、近年わが国で上昇の一途を辿る大腸癌は肉食生活への転換が原因とされる。世界的にも肉の消費量の多い国ほど大腸癌罹患率は高く、その間の相関関係が知られている⁴⁾。また高タンパク、高脂肪の食事により胆汁分泌が促進され、その胆汁酸には大腸癌のプロモーターとしての作用があることも知られてきている⁵⁾。この大腸癌の原因とされる物質のうちタンパク質を加熱した場合に発生するヘテロサイクリックアミン、たとえば3-アミノ-1-メチル-5H-ピリジン(4,3-b)イソトール(Trp-p-2)や、2-アミノ-3,4-ジメチルイミダゾリ(4,5-f)キノリン(MeIQ)などが知られている⁶⁾。これらの物質はグアニン付加体を形成するとされる。このような物質は大腸壁に油分と共に付着し、そこで大腸癌の原因となっている。それゆえ、野菜などの繊維質を肉と共に摂取し、腸内に長く滞留しないようにすれば罹患しにくいといわれるゆえんである。

逆の見方をすれば、滞留しなかったこれらの発癌性物質は、人体外へ排泄されし尿として下水中に存在することになる。事実、ヒトふん便中の強力な変異原物質には体内で生成されたとされるフェカベンゾエー-12及びフェカベンゾエー-14が単離され、これらは大腸癌との因果関係が指摘されている⁷⁾。早津は、喫煙直後の被験者の尿中に変異原性を強く検出することを報告し、さらに焼いた食物を摂取した後に、し尿中に変異原性が高くみられることを指摘している⁸⁾。

いずれにせよ、人間のし尿由来の物質が下水処理場あるいはし尿処理場に流入して生物学的に分解されているかに関しては未だ十分な知見が得られていない。食品を加熱して摂取するという文明を持ち得たヒトの排出物中に遺伝毒性物質が存在し、水環境を汚染する可能性があることは、従来発見されてきた汚染物質のように発生源対策ができるものではなく、処理場において高度処理の導入の必要性を示唆するものかもしれない。

以下本章においては、水環境へ流入する生活由来の誘起物質源として工場廃水を含む下水処理場、さらにし尿処理場の処理水を取りあげた。ここでは水中の有機物を濃縮法を検討し、遺伝毒性物質の効率より回収率を検討した。さらに濃縮有機物の分画成分中に遺伝毒性物質の検出を試みた。またし尿処理場で処理方向に遺伝毒性を調べ、し尿処理場の果たしている遺伝毒性成分の除去を検討した。

さらにこのような遺伝毒性を示す有機物質の制御の方法としてオゾン酸化に着目し、その効果を論じることとした。

第2節 都市下水中の遺伝毒性物質のumuテストによる検索

2-1 概説

都市下水、とくに工場排水の混合処理を実施している処理場においては、活性汚泥法などによる生物処理で分解し難い、生物難分解性有機物の存在が問題視されてきている。ここでは、そのような有機物質の濃縮法の検討をいくつかの樹脂について実施した。そしてその濃縮成分の分画を、分子量分画及び薄層クロマトグラフィーによる分画を行った。これら濃縮成分及び分画成分に関してumuテストを用いた遺伝毒性試験を適用した。さらにこのような処理水中に残存する遺伝毒性成分除去の方法としてオゾン酸化の適用を試みた。

2-2 実験方法

2-2-1 採水

サンプリングは1989年10月より1990年3月まではほぼ1カ月毎に、1990年10、11月さらに1991年2、3月に実施された。

採水は、A下水処理場、B下水処理場で実験目的に応じて、表5-1の様に実施した。概略は以下のようである。

①処理水中の有機物質によって示される遺伝毒性成分の検索のための採水を、1989年10月から1990年11月までに実施した。

②処理水中の遺伝毒性の週間変動を1991年3月に実施した。

③オゾン処理実験のための採水を1990年11月及び1991年2月に実施した。

採水時間は①③については午前10時頃、②については午前9時とした。

表5-1 採水

採水月	試料No.	試水	目的
1989年	10月 ①	A処理場処理水	遺伝毒性検出
	11月 ②	A処理場処理水	遺伝毒性検出
	12月 ③	A処理場処理水	遺伝毒性検出
1990年	1月 ④	B処理場処理水	遺伝毒性検出
	2月 ⑤	A処理場処理水	遺伝毒性検出
	3月 ⑥	A処理場処理水	遺伝毒性検出
	10月 ⑦	A処理場処理水	遺伝毒性検出、分画
	11月 ⑧	B処理場処理水	遺伝毒性検出、分画
	11月 ⑨	A処理場処理水	遺伝毒性検出、分画、オゾン処理
1991年	11月 ⑩	B処理場処理水	遺伝毒性検出、分画、オゾン処理
	11月 ⑪	A処理場沈後水	遺伝毒性検出、分画
	⑫	A処理場処理水	遺伝毒性検出、分画
	2月 ⑬	A処理場処理水	オゾン処理による分解
	3月 ⑭	A処理場処理水	遺伝毒性検出

2-2-2 測定項目

濃縮、分画、変異原試験以外の測定項目についてその分析方法とともに表5-2に

示す。

有機物の指標あるいは生物分解性の指標として、BOD、COD_{cr}、TOC、DOCを測定している。DOCは孔径0.45 μmのメンブランフィルターでろ別して測定した。

表5-2 測定項目

送入口オゾン濃度	酸性ヨウ素法
排ガスオゾン濃度	酸性ヨウ素法
残留オゾン濃度	酸性ヨウ素法
水温	温度計（サーモスタット定温制御）
pH	ガラス電極法
BOD ₅	下水試験方法
COD _{cr}	下水試験方法変法（フランドル・ベ社オートアナライザー）
COD _{Mn}	下水試験方法
TOC、DOC	島津住化TC-TN計

2-2-3 オゾン処理

試水のpHをほぼ7に調整し、ジャーファーメーター中に1.5L入れ、20℃定温制御後、オゾンガスを注入し、回転子で攪拌した。反応の前後に挿入オゾン濃度とガス流量を測定した。反応終了後、試水は直ちに残留オゾン濃度を測定するとともに、空気曝気してオゾン进行脱気し、有機物測定や、濃縮用のサンプルとした。試水中で消費されたオゾン量は次式で計算される。

$$\begin{aligned} \text{消費オゾン量 (mgO}_3\text{)} = & (\text{送入口オゾン濃度 (mgO}_3\text{} \cdot \text{L}^{-1}) - \text{排ガスオゾン濃度 (mgO}_3\text{} \cdot \text{L}^{-1})) \\ & \times \text{ガス流量 (L} \cdot \text{min}^{-1}) \times \text{反応時間 (min)} \\ & - \text{残留オゾン濃度 (mgO}_3\text{} \cdot \text{L}^{-1}) \times \text{反応液容量 (L)} \end{aligned}$$

なお、下水処理水やし尿処理水のオゾン処理については、田中らは、砂ろ過水に対しては $1.11 \text{ mgO}_3 \cdot \text{mgCOD}^{-1}$ 、好気性ろ床水に対しては $1.18 \text{ mgO}_3 \cdot \text{mgCOD}^{-1}$ の消費オゾンが必要であったとしている⁹⁾。また竹田は、下水2次処理水のDOC $10 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ に対してオゾン注入率 $10 \sim 20 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ を必要とした¹⁰⁾。加治らは処理水に対し $10 \sim 30 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ の注入率を示している¹¹⁾。さらに京都市の山内らは、 $1 \sim 2 \text{ mgO}_3 \cdot \text{mgC}$ の消費オゾンでTOC、色差、大腸菌の除去が可能であったことを示した¹²⁾。本論においてもこれらの値を参考に消費オゾン量を設定していくこととする。

2-2-4 濃縮、分画方法

サンプルの濃縮は、どのような試験に濃縮サンプルを供するかにより、採用する濃縮法が異なると考えられる。濃縮に用いられる方法にはたとえば表5-3のような方法が用いられている。

ここではなるべく多くの成分を捕捉すること、処理水中の遺伝毒性画分（多くは疎水性物質であるといわれる）を捕捉できることを念頭に濃縮法を検討した。

以下に本節で採用した濃縮法の特徴と濃縮・脱着法を示す。

表5-3 濃縮方法の種類

濃縮法

①減圧濃縮

ロータリーエバポレーターでサンプルを35℃温浴中で減圧濃縮した。サンプル中の疎水性、親水性両物質ともに濃縮する上では最も多くの物質を捕捉できる。一方で濃縮に時間がかかることと、多くのサンプルを処理できないため、濃縮倍率が若干低い等の欠点がある。また濃縮倍率を上げるためには塩析などの問題を克服する必要がある。さらに揮発性物質は濃縮過程で揮散する可能性が大きい。

本論ではサンプル1Lを東洋ろ紙5Cでろ過し、茄型フラスコにとり35℃温浴中で回転させながら減圧濃縮した。濃縮は50mLあるいは20mL（濃縮倍率20倍あるいは50倍）になるまでサンプルを減容した（試料①⑥）。

減圧濃縮法—ロータリーエバポレーター
減圧乾固法—凍結乾燥法
吸着濃縮法—多孔質樹脂
活性炭
イオン交換樹脂
多孔質中空糸膜
構造活性炭

②樹脂吸着

a) XAD2

変異原物質のような微量有機物をスクリーニングする場合、それがバクテリアアッセイにとって陽性を示す濃度にまで濃縮する必要がある。その濃縮倍率は河川水や下水で数百から数千倍、水道水では数万倍のオーダーとされる。この点から多孔質樹脂であるXAD樹脂は変異原物質の濃縮に多用されている。この中でもXAD2樹脂は頻繁に用いられ、そのジクロロメタン(DCM)画分は疎水性物質を、メタノール(MeOH)画分は弱疎水性物質を、さらにNaOH画分は親水性物質を表すとされる。しかしながらXAD2樹脂濃縮のDCM、MeOH画分のTOC回収率は1.0~33.3%（中室ら¹³⁾）、27%（亀井ら¹⁴⁾、オゾノ処理水）程度であり、多くの有機物質は回収され得ないことが示されている。

一方、同じポリスチレン性の多孔質樹脂でも、孔の数を多くした樹脂が開発され、XAD4（無極性）樹脂と同じ材質で孔数を増やしたCSP800とイオン性物質を吸着しうるCHPA25（いずれも三菱化成）を直列につなぎ、水道水中のE₂₅₄を81%吸着（通水前後の水中のE₂₅₄の差）した例がある（浦野ら¹⁵⁾）。

ここでは汎用されているXAD樹脂の適用を試みた。

XAD2樹脂はソックスレー抽出器でメタノール、ジクロロメタン、メタノールで各8時間ずつ洗浄し、メタノール中に保存した。これを使用時に10φ x 200mmのカラムに充填し、メタノールを通水して洗浄して、最後に純水で洗浄した。サンプル18LをpH2に調整して速度20 mL・min⁻¹でカラム通水した。これをジクロロメタン(DCM)、メタノール(MeOH)で2 mL・min⁻¹で順次脱着し、さらに減圧濃縮し、容量を1mLとした。

b) Sep-pak C₁₈カートリッジ（ミルバ社製Water Div.）

主としてサンプル中の疎水性物質を吸着濃縮するのに用いられる。容量1mLのカートリッジタイプで取扱が簡単であり、かつ現場での使用にも適用できる。

サンプル20Lをカートリッジに定量ポンプで20 mL・min⁻¹の流量で流下させる。これにジクロロメタン(DCM)（残農用）を2 mL・min⁻¹で通し、続いてメタノール(MeOH)（残農用）

を $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ で通し、各々 DCM 画分、MeOH 画分とした。両画分を各々ロータリ-エバポレーターで減圧濃縮し、途中で純水を加え最終的に 1000 倍～2000 倍に濃縮した（試料②～⑭）。

③構造活性系

Blue Rayon（フナジ薬品製）

岡山大学薬学部早津研究室で開発された樹脂であり、Blue の色素はトリスル銅フタジニオンをレゾンに共有結合で固着したものである。主として多環芳香族化合物で環を 3 個以上持つものを選択的に強く吸着する。Blue Rayon は自然水域中で河川中に吊して物質を吸着する方法（懸垂法）がとられることが多いが、ここではカラム中に充填し、サンプルを通水した。

Blue Rayon 0.5 g を 10 mL シリソジに充填し、これにサンプル 20 L を $20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の流速で通し、アモニア：メタノール (1:50) に樹脂をいれ 30 分間振とうして吸着物質を脱着した。これを 2 回繰り返す、溶媒をエバポレーターで減圧濃縮し、中途純水を加え、最終的に 1000 倍の濃縮液をつくった（試料③⑤）。

分画法

分子量分画は Sephadex G-25 および LH-20 ゲルを用い、これをガラスカラムに充填した。これにサンプルを通水し、分画したサンプルをフラスココレクターで分取した。分画サンプルは E_{220} 、 E_{260} および TOC を測定し、オゾン処理による分子量分画と比較した。分子量分画に供したのは試料⑤である。

また他の分画法としては薄層クロマトグラフィ (TLC) を適用した。TLC は最初、分析用として逆相スポットフィルム C_{18} シリカゲル（東京化成）を用いて展開した。展開溶媒はメタノール：水 = 1:1 とした。ついで分取用の TLC として RP-18 F254 s, 1mm (Merck) を用い、濃縮試料 0.1 mL を滴下し、同じ展開溶媒で展開後、各画分をかきとり、各々をメタノールで再抽出、加温して各画分を水に置換して 0.1 mL とした。分画に供したのは試料⑦～⑫である。

2-2-5 遺伝毒性試験法

遺伝毒性試験法には、第 2 章で示した umu テストを採用している。但し試水に着色している場合は、反応後、遠心分離して上澄を除去、菌体を洗浄後、生理食塩水に懸濁させてから、 β -galactosidase 活性を測定した。

2-3 各試料の水質値

各試料水の水質値を表 5-4 に示す。水温はオゾン処理時には 20°C に調整してある。

表5-4 各試料の処理水の水質値

試料No.	処理場	水温 ℃	pH	SS mg・L ⁻¹	BOD mg・L ⁻¹	COD _{Mn} mg・L ⁻¹	TOC mgC・L ⁻¹	DOC mgC・L ⁻¹
①	A							
②	A	18.4	7.4	7	19	15	10	7
③	A	19.0	7.6	5	11	21	14	10
④	B	13.5	7.6	6	17	34	21	15
⑤	A	16.8	7.4	1	5.2	22	14	10
⑥	A	14.0	7.3	5	10	33	15	8
⑥	B	14.1	7.6	8	16	35	20	11
⑦	A	21.3	7.3	1	13	19	14	10
⑧	B	20.3	7.7	8	18	35	20	14
⑨	A	20.3	7.3	4	19	20	15	11
⑩	B	20.5	7.5	6	19	34	22	16
⑪流入水	A	17.0	7.2	70	95	70	52	35
⑫処理水	A	17.5	7.0	5	9	14	10	8
⑬	A	13.4	7.6	8	5.6	25	-	16
⑭	A	13.4	7.4	4	15	28	16	12

2-4 濃縮法と有機物の吸着効率

減圧濃縮の有機物収支の結果を図5-1（試料①⑥）に示す。左側には処理水原水を、右はそのオゾン処理水の構成を表している。それぞれのグラフ中の数字は全有機物量を100%としたときのパーセントを表している。これらの図より未回収分は減圧濃縮により揮発したものと考えられる。これらの図より概ね60%以上の有機炭素が捕捉され、濃縮されたことがわかる。

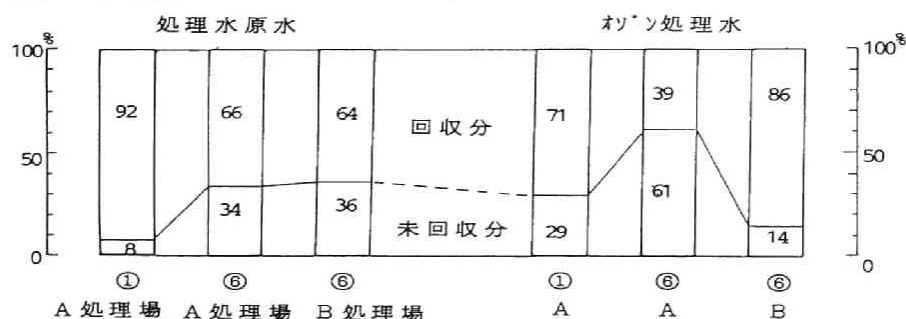


図5-1 減圧濃縮による有機炭素収支

図5-2にはXAD2樹脂とBlue Rayonの吸着結果を示した（試料②③⑤）。図中未吸着分は吸着されずに樹脂を通過した量を表している。またジクロロメタン、メタノール、アモニア-メタノール画分は同様に濃縮・脱着を経て回収された画分を表す。本図よりXAD2樹脂では原水中のTOCの56%が、またオゾン処理水では16%が吸着した。このうちジクロロメタン画分、メタノール画分として溶離・回収し得たのは、原水で各々7%、4%、オゾン処理水で5%、2.5%にすぎなかったことがわかる。XAD2樹脂による下水中有機物のいわゆる疎水性、弱疎水性物質の回収は高々全有機物の10%程度であったことがわかる。このような結果は、中室らの結果にも示されている¹³⁾。

またBlue Rayonでは、最終的に回収できた有機物はTOCで全量の7~8%程度であった。これはこの構造活性系が3環以上の多環芳香族化合物を選択的に吸着することにより全TOC量のうち、それが占める割合がこの程度であると考えてよいことを示している。

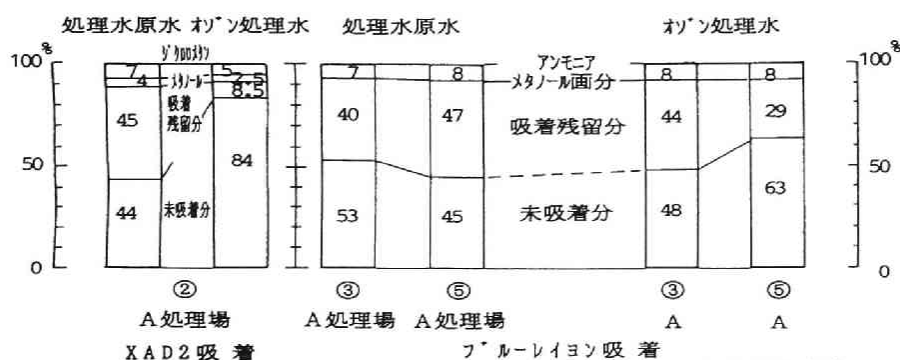


図5-2 XAD2, Blue Rayon濃縮による有機炭素収支

図5-3にはSep-pakカートリッジにおけるTOC吸着・回収の結果を示した(試料②③④⑤)。図より、原水で吸着した割合、即ち全量－未吸着分は22～68%、このうちシクロメタン画分が2.5～15%、メタノール画分が4～29%となっている。一方、オゾン処理水は原水に比して若干、Sep-pakによる吸着した割合が低く、19～59%である。このことはオゾン処理により、より有機物の親水性が増し、Sep-pak樹脂に吸着しにくくなったためかもしれない。このうち、シクロメタン画分は4～8.5%、メタノール画分は1.4～21%であった。

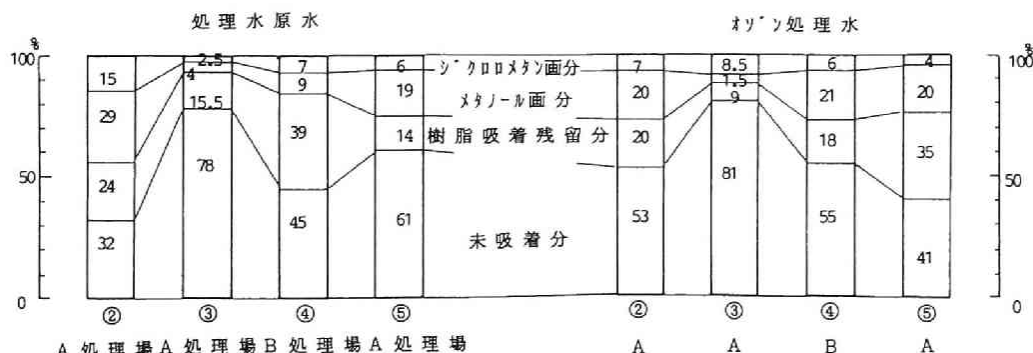


図5-3 Sep-pak濃縮による有機炭素収支

これらの値は前述の減圧濃縮に比べると、減圧濃縮が有機物の種類としてはより多くの物質を回収していると考えられるものの、濃縮倍率としては樹脂吸着による有機炭素の回収がはるかに高いことがわかる。このように濃縮は、その濃縮試料の用途目的に応じて濃縮法が選択されるべきであると考ええる。本論では以上に示したデータより遺伝毒性試験に供するために疎水成分を抽出するという点ではSep-pak樹脂が比較的優れていると考えられる。遺伝毒性、変異原性には弱疎水、疎水性画分が多いという定説に基づいて、この結果より特にSep-pak-メタノール抽出画分が優れていると考えられる。またSep-pak樹脂は他の吸着樹脂に比較すると、カートリッジタイプで取扱がはるかに簡単である。XAD樹脂のように溶媒による洗浄を繰り返す必要はない。また処理場の現場での対応も可能で大量の水を数mLのカートリッジ内に収める利点を有している。

2-5 遺伝毒性

試料①のA処理場処理水およびそのオゾン処理水の減圧濃縮試料のumuテストの結果を図5-4に示す。図より+S9mix系で、両試水ともほとんど遺伝毒性は認められない。これは減圧濃縮の濃縮倍率が20倍と低く、それぞれ投与した有機炭素量は試験菌懸濁液中で高々 $7\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ と $6\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ であり、有機物濃度が低すぎたため、陽性が検知できなかった可能性がある。

次に図5-5においてA処理場試料②においては、XAD2によるジクロロメタン画分、メタノール画分には陽性は検知できなかった。これらもXAD2により回収された有機炭素量が1800倍の濃縮でもジクロロメタン画分で 13mgC （処理水原水）、 4mgC （オゾン処理水）、またメタノール画分で 8mgC （処理水原水）、 2mgC （オゾン処理水）と比較的低濃度であることによるのかもしれない。

一方、Sep-pak C_{18} によるジクロロメタン画分、メタノール画分は-S9mixではほぼ陽性は認められなかったが、+S9mixにおいて原水のメタノール画分に対する約2倍という比較強い陽性が認められた。これはTOCでみると 71mgC の投与である。この遺伝毒性はオゾン処理を施すことによって約6分の1、対照よりも低い状態にまで減じることができた。

次に図5-6においてA処理水試料③の試水の1000倍濃縮の試料に関しSep-pak C_{18} のジクロロメタン、メタノール画分と、Blue Rayonの吸着物質について遺伝毒性を示した。この図より原水のSep-pakのメタノール画分に-S9mix、+S9mixともに対照に比べて強い陽性を認めることができた。これらはオゾン処理によって-S9mixでは未だ完全に陽性は消滅しないものの、+S9mixでは対照程度に減じることができた。またBlue Rayonで回収した成分に関しては陽性を認め得

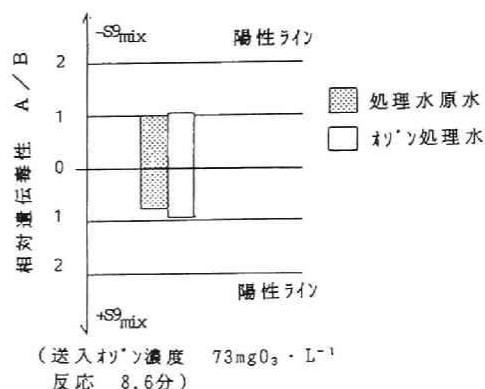


図5-4 試料① umuテスト結果

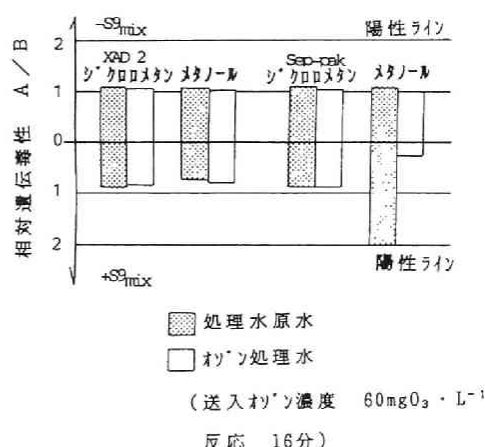


図5-5 試料② umuテスト結果

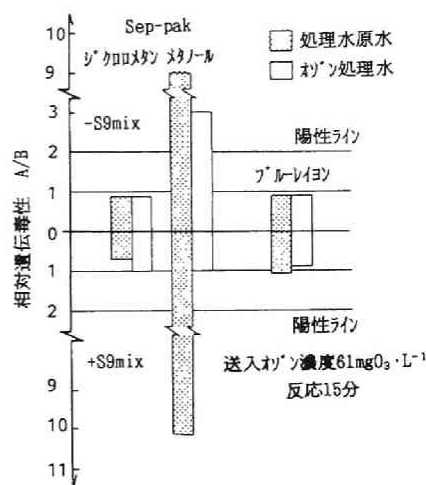


図5-6 試料③ umuテスト結果

なかった。

図5-7にはA処理場処理水試料⑤の1000倍濃縮のumuテスト結果を示してある。Sep-pakC₁₈、Blue Rayonのうち比較的陽性を示したのは、原水のSep-pakC₁₈のメタノール画分の+S9mixのものであり、図5-6の結果と同様な傾向を示した。ここでもオゾン処理により遺伝毒性は減じている。またBlue Rayonでは陽性を認められなかった。

以上の結果より、処理水中には遺伝毒性物質を含むと推定される。また+S9mixでより強く陽性が検知できることより、肝酵素ブクロ-MP450等による代謝活性化効果がみられることになる。またこの遺伝毒性物質はオゾン処理（送入オゾン 40～60 mgO₃・L⁻¹、ガス流量 0.5 NL・min⁻¹、接触時間10～15分）で、その毒性を減じ、溶媒対照（A/B=1のライン）とほぼ同等あるいはそれ以下に低減することができた。

試料⑦⑧⑨⑩の処理水中の遺伝毒性のdose responseを図5-8に示す。横軸には、Sep-pakC₁₈のメタノール画分による濃縮試料の、試験菌懸濁液中の濃度を 1=240mgC・L⁻¹としてその希釈倍率を表示してある。図中の横線は遺伝毒性陽性を示すライン、すなわちコントロール（純水）の2倍値である。

試料と試験菌株との反応は、2時間にて陽性を示したが、時間的なumuDC遺伝子の誘発をみると図5-9に示すように4時間目にして最大値を示した。ここでは成分中の遺伝毒性とその減少を明確に知るため、反応を4時間に設定して実施した。図より、いずれの場合も試料の投与量が増加するにしたがい遺伝毒性が増加するdose responseが得られている。

A処理場においては、試料⑦と⑨の試水において、投与量240mgC・L⁻¹で代謝活性有無両系で陽性が検知されている。このうち、比較的代謝活性系で陽性がより強く、陽性閾値の2倍から3倍を示した。このことは試料①～⑥の結果とも

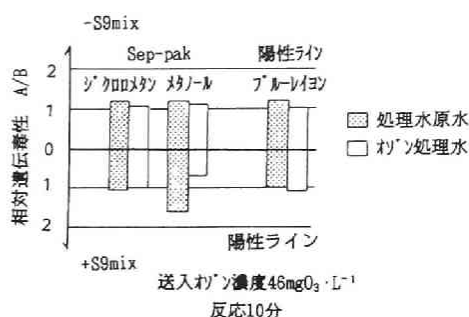


図5-7 試料⑤ umuテスト結果

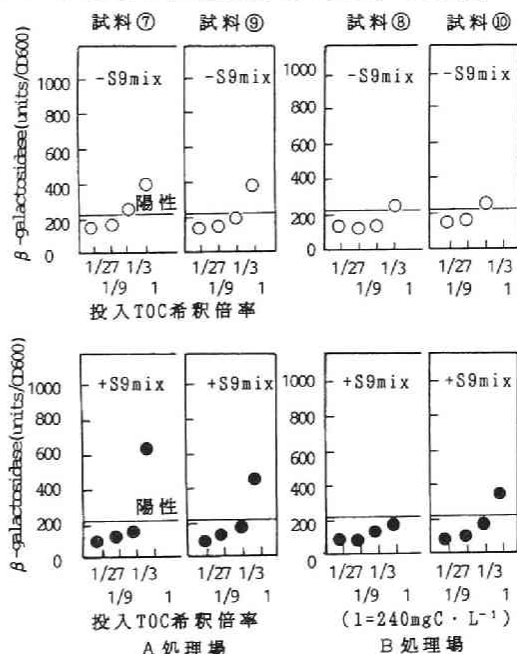


図5-8 A, B処理水の遺伝毒性

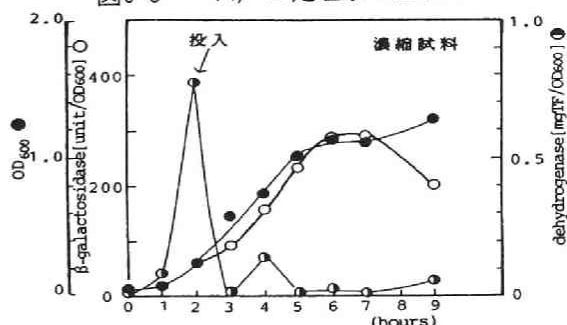


図5-9 処理水の遺伝毒性誘発の経時変化

一致しており、A 処理水中には代謝活性系で遺伝毒性陽性を示すものの存在することが示唆された。

一方、B 処理場の処理水においても、試料⑧には-S9mix系に若干の陽性がみられた。また試料⑩には代謝活性有無両系で陽性が、特に-S9mixで強く見いだされ、陽性閾値の約5倍の値を示した。

図5-10には試料⑪⑫より、A 処理場の最初沈殿池流出水と処理水の遺伝毒性の比較し生物処理の効果をみている。図より原水中に強い毒性が示されていることがわかる。しかしながら処理水中の遺伝毒性は減少し、-S9mixで約1/3、+S9mixで約1/7になっている。このことは、生物処理を通過することで遺伝毒性物質はある程度減少していることを表している。

上記で検知できた遺伝毒性陽性の成分が、工場排水由来の生物難分解性の有機物のものと推定すれば、工場操業が休業となる週末には、上述したような陽性画分は減少するような週間変動が観察できる可能性がある。そこで、ここでは処理水中の遺伝毒性を一週間の間、毎日9時に採水したものの試料⑭の濃縮試料に関して測定した。結果を代謝活性有無両系に関して図5-11に示した。

いずれの試料も Sep-pakC₁₈、メタノール画分で、濃縮倍率を2000倍としたが、投与量を各ケースで同じ量となるよう調整してある。試験菌株との反応時間は4時間とした。

図より、-S9mixの系では、金曜日以外はほとんど陽性を検出しなかった。一方の+S9mixの系では

ほぼ毎日陽性が検出されている。土曜日、日曜日には他の曜日よりも若干遺伝毒性強度が減少していることから、検出された遺伝毒性成分が工場由来のものであることを疑わせるようなパターンとみられる。しかしながら、この土、日曜日に毒性が全く消失したわけではなく、他の日常的に排出されている物質の原因であること、たとえばし尿のようなものが原因となっていることも考えられる。

以上のように、下水中に含まれていると考えられる遺伝毒性成分は、生物処理

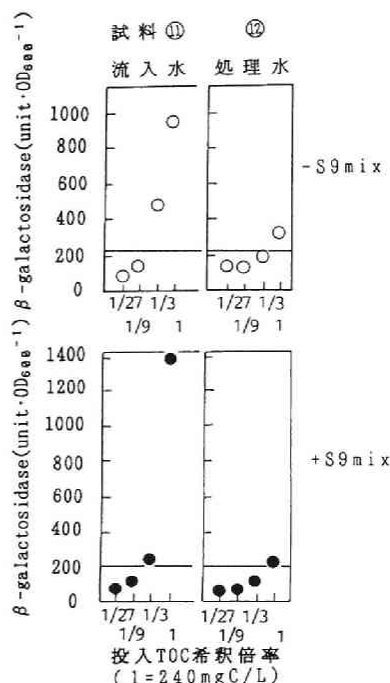


図5-10 流入水と処理水の遺伝毒性の比較

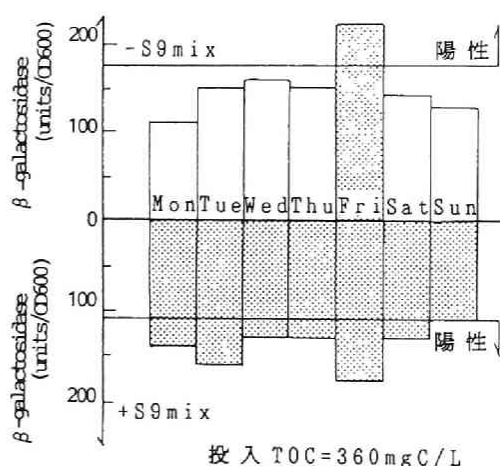


図5-11 一週間の処理水中の遺伝毒性

である程度除去可能であるものの、なお処理水中に残存し、処理水に対して高度処理の必要性があると考えられ、以上の項中で示したようにオゾン酸化が効果があることがわかった。

2-6 分画

2-6-1 分子量分画

Sephadex G-25ゲルを用いてゲルろ過をし、原水（2次処理水）とそのオゾン処理水中の分画を試みた。G-25ゲルにより分画しうる分子量はほぼ 1000から5000程度である。

図5-12には試料①の原水とそのオゾン処理水の分画結果のうち、 E_{220} と E_{260} を示してある。図より E_{260} でブルーデキストラン（分子量2,000,000）が示したフラクションNo. 42（溶出液量420mL）付近に原水ではピークを生じ、またビタミン B_{12} （1355.6）がピークを示したNo. 70~90（溶出液量700~900mL）にかけても分画成分が認められた。このうちNo. 42の分子量が5000以上の比較的高分子の画分は、オゾン処理を施すことによって消滅していることがわかる。しかしながらNo. 70~90の成分は若干減じているにすぎない。

E_{220} は主として NO_3 のような物質を分画するのに測定されたが、オゾン処理によりこのピークは増加している。つまり硝酸イオンのような220nm付近の波長に大きな吸光度を示す物質が生成したといえる。

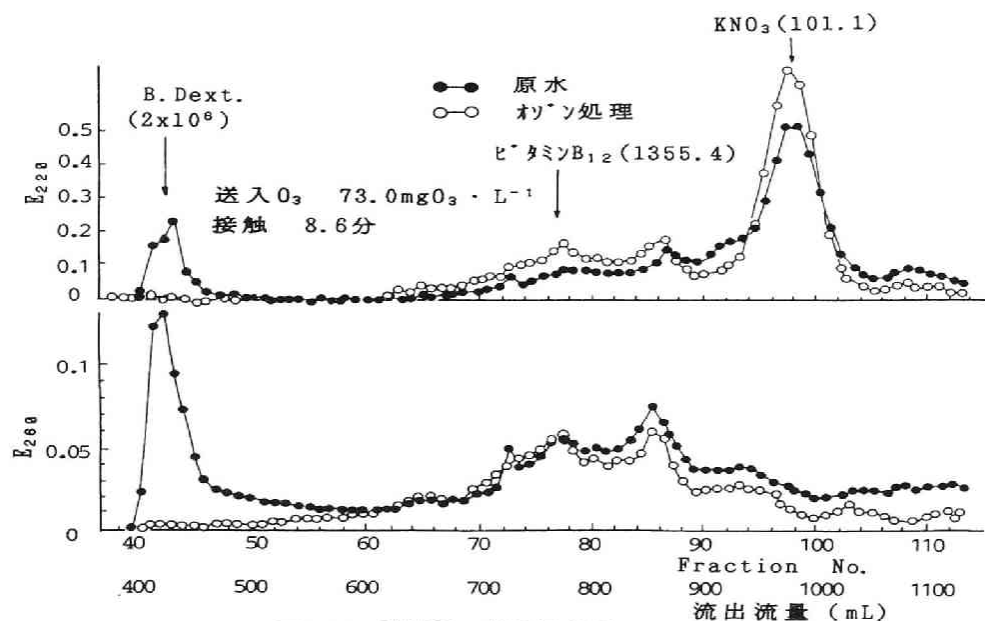


図5-12 試料① 分子量分画

キャリアにメタノールを用いたため分画した試料中の有機物量を定量することはできない。そこで原水のSep-pak C_{18} 吸着、MeOH画分に関し、LH-20で分画した各分画試料につき、その変異原性を知るためにumuテストに適用した。結果を図5-13に示す。

これらの画分のうち、umuテストで陽性を示したのはNo. 5成分で比較的強い反応が示された。以上の結果より、分画分子量5,000以上の比較的高分子の画分に遺伝毒性の強い成分が存在することがわかった。

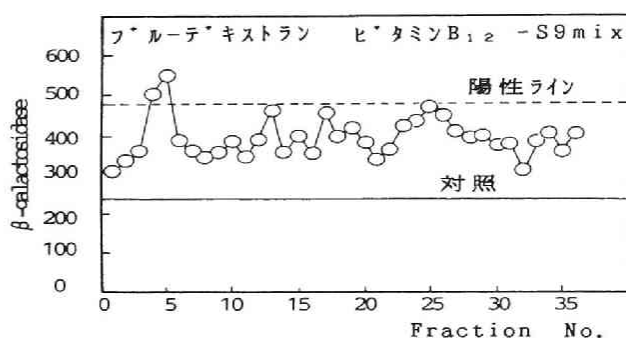


図5-13 分子量分画試料の遺伝毒性

2-6-2 薄層クロマトグラフィ(TLC)による分画

2次処理水中に残存したと考えられるSep-pakC18、メタノール画分有機成分を分画するため薄層クロマトグラフィを適用した。

まず、処理水の濃縮試料の分画に適したTLCプレートの種類、並びに展開溶媒を決定するために、0.25mmの分析用のTLCプレート数種類について検討した。その結果、可視光線下で比較的画分をきれいに分けられたのは、東京化成工業の薄層クロマトグラフィ用逆相スポットフィルムC18シリカゲル(5×10cm, 0.25mm)で、展開溶媒はメタノール：水＝1：1の溶液を用いた。

このTLCプレート上に、試料を一滴下し、密閉したガラス容器中で展開した結果が図5-14である。図より、各画分のRf値(移動率、Rate of flow、原点から各物質のスポットの中心までの距離／

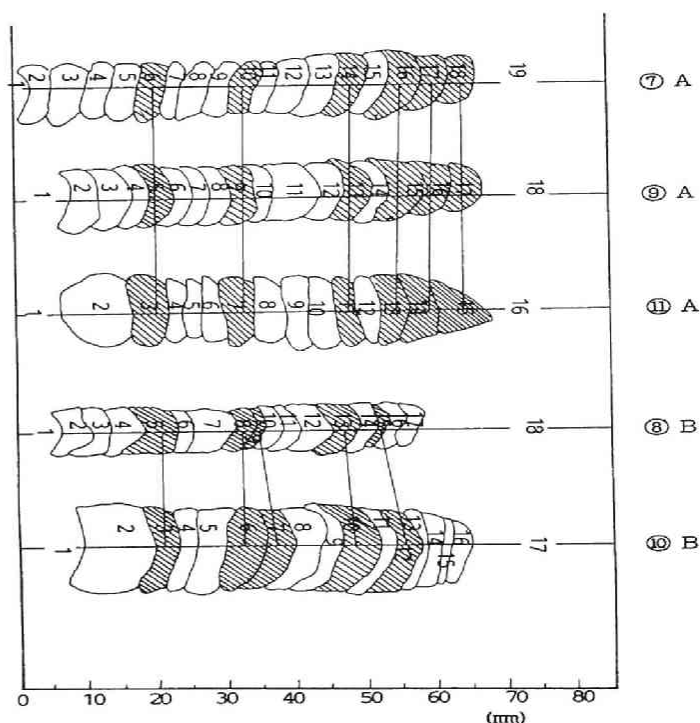


図5-14 処理水のTLC分画

原点から溶媒の浸透先端までの距離)が計算できる。このRf値は物質の判定基準となり、同じTLCプレート、展開溶媒、展開条件ならば、既知物質の同定が

可能となる。

A 処理場処理水の試料⑦⑨⑪のTLCプレート可視光線下で比較すると、3日間で同じRf値を有する画分がいくつかあった。それらを実線で結んでみた。試料⑦のNo.6、No.10、No.14、No.16、No.17、No.18は、いずれも試料⑨及び⑪の同じ位置にもほぼ出現している。このことより同処理場で同時刻には、ほぼ同じ成分が流入している可能性が強いことがわかる。

同様に試料⑧⑩のB処理場のTLCプレートを比較すると、これらもほぼ同じRf値を有する可視光線下の成分が両日の間に存在する。試料⑧のNo.5、No.8、No.9、No.13、No.15は試料⑩のプレート上にも出現している。

図5-15には、試料⑭の一週間のA処理場処理水の濃縮試料のTLCプレートを示した。金曜日のTLCプレートのNo.7、No.12、No.20は一週間、同一Rf値で出現しており、休日にもかかわらず、処理場に流入してきた成分と考えられる。また金曜日のNo.17、No.19は、金、土曜日そして火、水、木曜日のみ出現した。これはサブリング時間が毎朝9時であることより、処理水中の成分は市内で夕刻から夜中にかけて放流されたものと考えられ、平日に流入してくる成分とみなせる。

以上の5成分は前記試料⑦⑨にもほぼ同Rf値の成分として検出されており、常時、A処理場に流入してくる成分とみなせる可能性が高い。一方、日曜日、月曜日はその前日に放流されたものが示されているが、他の平日と異なるのは日曜日のNo.11とNo.12の成分である。このように土、日曜日は工場排水量は減じていると推察できるものの、その成分中には、一週間通じて共通と思われるものも含まれていることがわかった。

逆相シリカゲルC₁₈でメタノール：水＝1：1で濃縮成分が展開できることがわかつ

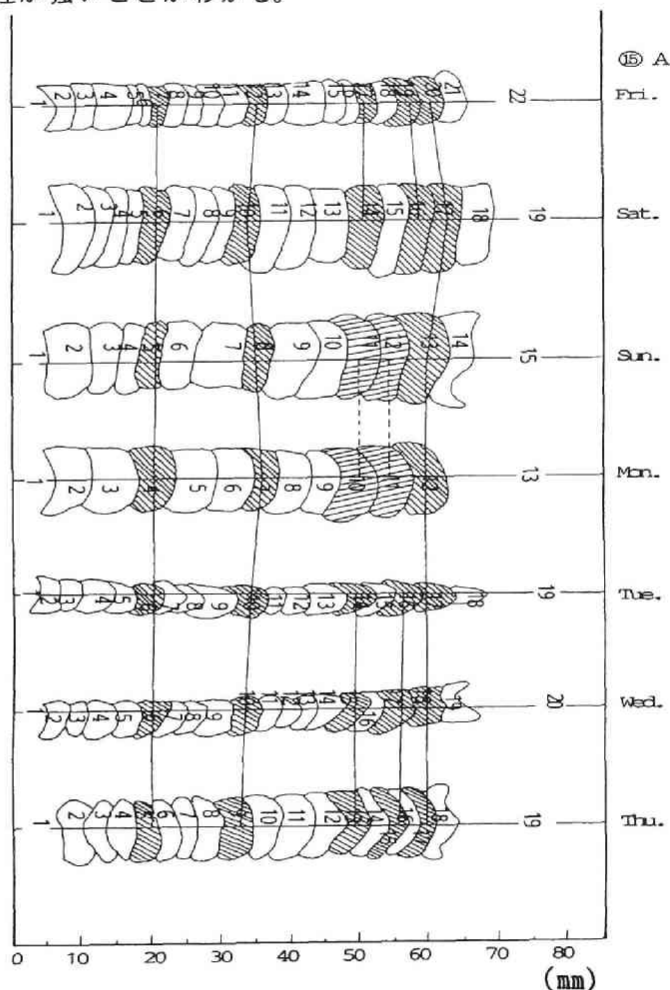


図5-15 一週間の処理水のTLC分画結果

たので、この成分を抽出するために、厚さ1mmのTLCプレート（Merck, RP-18 F254s）を利用した。濃縮試料 0.1mLをTLCプレート上に滴下し、メタノール：水 = 1：1 溶液で展開、乾燥後、各々の画分を削り落とした。各々にメタノールを加え、画分を抽出し、温浴中で減容して、最終的には純水に置換し、0.1mLとした。この画分をumuテスト+*S9*両系で、反応時間4時間で試験した。

A 処理場試料⑨処理水の結果を図5-16に示す。上段に菌体濃度を示すOD₆₀₀を、下段に遺伝毒性β-galactosidaseが示されている。

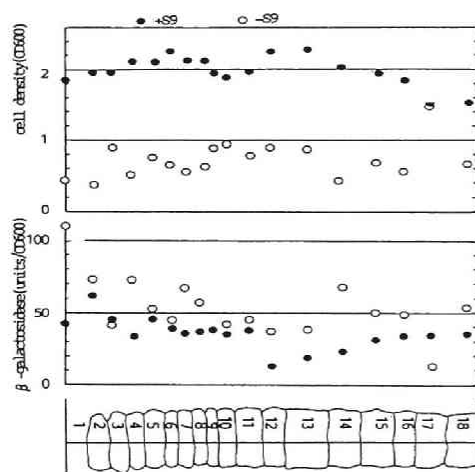


図5-16 試料⑨ TLC分画の遺伝毒性

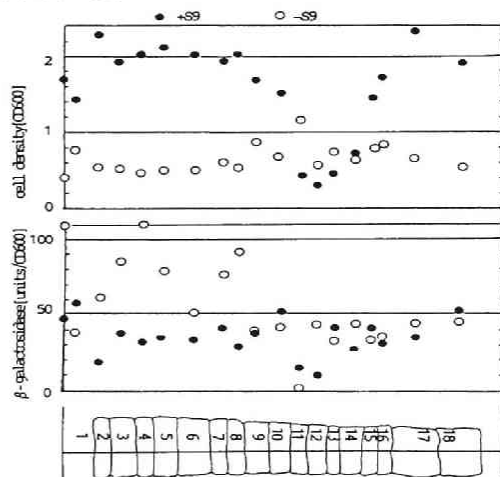


図5-17 試料⑩ TLC分画の遺伝毒性

いずれもコントロール系と同等もしくはそれ以下の値であり、混合試料で強い陽性を示していたものが、分画することで分散したものと考えられる。

相対的な値で比較するならば、試料⑨の-S9mixではNo.2、No.4、No.7、No.14が、+S9mixではNo.2が比較的β-galactosidase活性が高かった。

B 処理場試料⑩の分画成分を図5-17に示す。-S9mixでNo.4、No.8に、+S9mixでは、No.1、No.10、No.18が比較的遺伝毒性が高かった。一方、細胞の増殖抑制が+S9mix系で強くみられたものが、No.11、No.12、No.13、No.14でこれら成分は細胞毒性を示すものと考えられる。

2-7 オゾン処理による遺伝毒性物質の除去

図5-18には、A 処理場処理水の試料⑬をオゾン処理することにより、その有する遺伝毒性の減少を消費オゾン量に対して検討した。図中の実線は遺伝毒性陽性を示すβ-galact

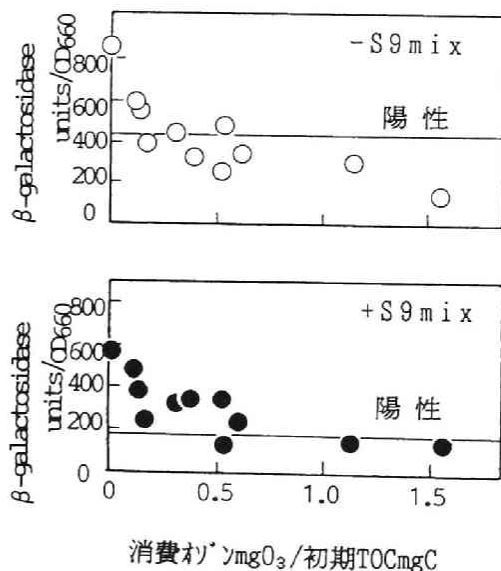


図5-18 試料⑬ 処理水中遺伝毒性のオゾン処理

osidase値である。遺伝毒性は無オゾン処理水では、陽性閾値の2～3倍値を示しているが、オゾンの消費量が増加するにつれて減少する。代謝活性有無両系とも、ほぼ $0.5\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ のオゾン量でSep-pakC₁₈のメタノール画分にみられた遺伝毒性陽性は、消失することがわかる。

処理水を持つ遺伝毒性が、 $0.5\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ 程度のオゾン消費量で消失しうることがわかったので、この程度の消費オゾン量で処理した処理水を、TLCで分画し、どの成分が消失したの

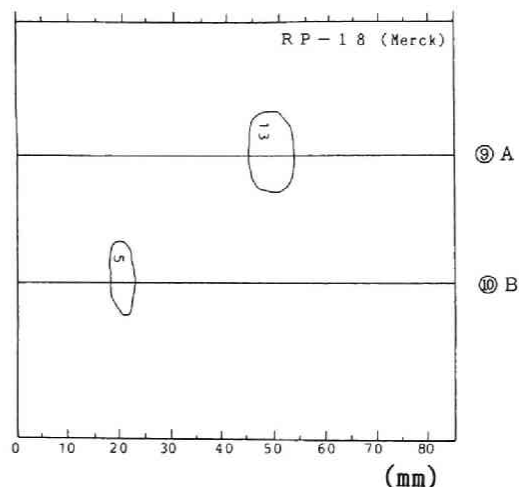


図5-19 オゾン処理水のTLC分画結果

かを検討した。結果を図5-19に示した。RP-18ゲルではA処理場の場合には、No. 13、B処理場はNo. 5のみが可視光下で観察できた。他の成分はほとんど消失したことがわかる。

2-8 まとめ

本節では、都市下水に含まれている遺伝毒性物質をumuテストを用いて検討した。以下に得られた成果を示す。

①都市下水処理水中の有機物を濃縮して回収する簡便法を選択するために、既往の濃縮法を検討した。XAD2樹脂吸着、Blue Rayon吸着及びSep-pak樹脂吸着でその有機炭素の回収率より、Sep-pakC₁₈のメタノール脱着画分が4～29%と比較的高い回収率を示した。

②これら各種吸着法の濃縮成分を、umuテストに適用したところ、遺伝毒性陽性はSep-pakのメタノール画分で強く検出され、特に+S9mix系でより強く検知された。このことは都市下水処理水中に残存している有機物中には遺伝毒性を示す様な成分が含まれていることを示された。この様な回収にはSep-pakC₁₈樹脂が比較的有效であり、また操作が簡単であることが示された。

③調査した処理場では一週間通して処理水中に遺伝毒性が検出され、日常的に都市下水中に流入する可能性のある有機物に由来していることが示唆された。このことは、薄層シメタグラフィを用いた分画した成分中にも一週間通して、同じ成分と考えられるものが存在したことから類推される。

④遺伝毒性を示した有機物は、都市下水中に含まれていたと考えられ、曝気槽流入水中にも検出できたが、+S9mix系で約1/7と、生物処理過程である程度減少していることがわかった。

⑤分子量分画の結果から、遺伝毒性成分は分子量5,000以上の比較的高い成分である。オゾン酸化によりその遺伝毒性成分は、処理水の有する有機炭素量に対する消費オゾン量で、約 $0.5\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ で消失しうることがわかった。

第3節 し尿中の遺伝毒性の検索と制御

3-1 概説

本章の第1節でも指摘したように、ヒトふん便中に存在するような加熱食品中の多環芳香族炭化水素、あるいは体内で代謝された化合物が強い遺伝毒性を有することが知られつつある。それら物質が混入している都市下水処理場では、日常的に処理水中においても遺伝毒性を有する物質が検出されることは前節で述べた。

本節ではそのヒトふん便を主として生物学的処理をしているし尿処理場において、生物処理水中に残存している有機物の遺伝毒性を検討し、さらに処理場の処理方向について各々の試料を濃縮した。ヒトふん便中に遺伝毒性物質が含有されているとすれば、処理が進行するにしたがい、消長していく過程を追跡した。

3-2 実験方法

3-2-1 採水

試料はC、D2つのし尿処理場において採水された。

C処理場においては生物学的処理を施した後、活性汚泥の固液分離にUF膜処理を適用している。試料はこのUF膜処理水を1990年2月と1991年8月に採取した。

D処理場においては、処理場の処理方向にしたがい、1992年7月に2回採水した。採水箇所は①生し尿②除し尿③生物反応槽混合液④脱離液⑤脱水槽分離槽⑥凝集沈殿上澄水⑦砂ろ過水⑧活性炭処理水である。

これらのC処理場UF膜処理水と、D処理場の①～⑧の試料の水質値を表5-5に示す。

表5-5 試料の水質値

C処理場

測定項目	90年2月	91年8月
pH	5.06	4.98
水温 (°C)	13.0	12.5
アンモニア性窒素mgN/L	377	457
硝酸及び亜硝酸性窒素 mgN/L	537	604
OD ₄₁₀	0.410	0.366
OD ₆₆₀	0.069	0.058
OD ₆₈₀	0.021	0.018
TOC mgC/L	129	93.6
BOD mg/L	18.5	14.1

D処理場

92年7月15日								
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
TOC mgC・L ⁻¹	32560							
DOC mgC・L ⁻¹	5717	3847	202	233	222	19.3	18.6	7.3
92年7月16日								
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
TOC mgC・L ⁻¹	47880							
DOC mgC・L ⁻¹	3991	3833	334	540	291	23.5	16.2	5.6

3-2-2 試料の濃縮

試料の濃縮には、まず採水した試料に固形物を含む場合には、これを3000rpm、10分間遠心分離し、その上澄を東洋ろ紙5Aでろ過し、さらにそのろ液を東洋ろ紙5Cでろ過し、溶解性試料とした。この溶解性試料はSep-pakC₁₈樹脂にてその含有有機物質を吸着した。通過速度は20mL・min⁻¹である。吸着した有機物はメタノールにて2mL・min⁻¹の速度で脱着した。

遠心分離した固形物は、固形性試料としてこれにジクロロメタンを1:1の割合で入れ、茄型フラスコにて振とうし、固形物中の疎水性物質を液液抽出した。ただし、①生し尿以外の②③④はジクロロメタンに溶解し、抽出できなかった。これらは固形物そのものが疎水性に近くなっていると考えられる。液液抽出した有機物は、ロータリーエバポレーターでジクロロメタンを蒸発させ、乾固した有機物にDMSOを添加した。以上の濃縮試料の作成と濃縮倍率をまとめて表5-6に示す。

3-2-3 遺伝毒性試験法

前節と同様、umuテストを適用した。ただし試料はほとんどが着色しているため、試験菌との反応後、これを遠心分離し、菌を生理食塩水で洗浄したのち、生理食塩水に懸濁させてから酵素活性を測定した。

表5-6 濃縮法と濃縮倍率

C処理場膜処理水	Sep-pakC ₁₈ 吸着—メタノール抽出— 蒸発乾固—DMSO溶解	1000倍	
		7.15	7.16
D処理場①溶解性	同上	33倍	33倍
D処理場②溶解性	同上	33倍	33倍
D処理場③溶解性	同上	33倍	33倍
D処理場④溶解性	同上	33倍	33倍
D処理場⑤溶解性	同上	33倍	33倍
D処理場⑥溶解性	同上	162倍	167倍
D処理場⑦溶解性	同上	293倍	333倍
D処理場⑧溶解性	同上	292倍	333倍
D処理場①固形性	ジクロロメタン液液抽出—蒸発乾固— —DMSO溶解	6.2倍	1.6倍

3-2-4 オゾン処理の適用

処理に用いた装置を図5-20に示す。反応器は容量3Lのガラス製ハーフボール型で、槽内の攪はんにはマグネティクスターを用いた。オゾン発生器は富士電機製無声放電式FOPX-40型で高純度酸素を酸素源とした。

試水はC処理場試料で回分式で処理した。試水2Lを反応器にいれ、送入オゾ

ン濃度とガス量を設定した後、オゾン曝気を開始し、経時的に、試水及び排オゾントラップ内の、2%KIを採取した。試水は一部亜硫酸ナトリウム溶液を直ちに投入して、溶存オゾンを消費させ、空気曝気し、有機物等の測定に供した。反応槽内で消費したオゾン量の算出は前節で示したものに依った。

オゾン処理反応条件を表5-7に示す。反応のパラメータは、送入オゾン濃度、及び送入ガス流量であり、それらを表の縦横に記し、表中には反応時間が示されている。

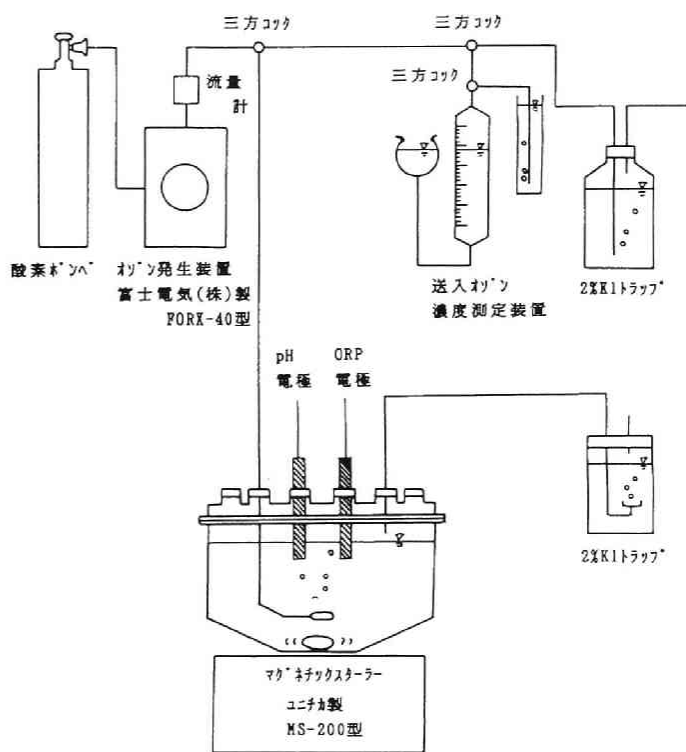


図5-20 オゾン反応装置

表5-7 反応条件

オゾン処理条件				
↓ガス流量L/分	送入オゾン濃度、mgO ₃ ・L ⁻¹			
	20	30	40	
1	60分	30分		90年2月試料
3	30分	20分	20分	
5	20分	20分		
1	40分			91年8月試料
3	30分			

3-2-5 測定項目

実験に際し、測定した項目、及びその方法を表5-8に示す。着色の指標には、し尿処理水中の黄色および赤色を主として代表するものとして、OD₄₁₀およびOD₅₅₀を各々選んだ。またBODは生分解性の指標として測定した。

表5-8 測定項目

測定項目	測定方法
pH	東亜電波工業製pH電極GST-5311C
水温	同上
オゾン濃度	酸性ヨウ素法
アンモニア性窒素	インドフェノール法
硝酸及び亜硝酸性窒素	N-(1-ナフチル)-エチレンジアミンスルホン酸法 (フランドル社製オートアナライザ)
OD ₄₁₀	分光光度計 島津UV-240
OD ₅₅₀	
OD ₆₆₀	
TOC	島津TOC計 TOC-5000
BOD	下水試験方法に準拠

3-3 し尿中の色素、難分解性成分のオゾン酸化による除去

3-3-1 消費オゾン量に対する色素、BODの挙動

単位有機物当りの消費オゾン量は回分式実験の場合、以下のように式示できる。

$$(P_i Q_G T - P_o Q_G T - xV) / yV \quad (1)$$

ここで P_i : 送入オゾン濃度 ($\text{mgO}_3 \cdot \text{L-gas}^{-1}$), P_o : 排ガスオゾン濃度 ($\text{mgO}_3 \cdot \text{L-gas}^{-1}$),
 Q_G : ガス流量 ($\text{L-gas} \cdot \text{min}^{-1}$), T : 反応時間 (min),
 x : 溶存オゾン濃度 ($\text{mgO}_3 \cdot \text{L-liquid}^{-1}$), V : 反応器容積 (L),
 y : 有機物濃度 ($\text{mg} \cdot \text{L-liquid}^{-1}$)

また連続反応槽の場合、

$$((P_i - P_o) Q_G - x Q_L) / y Q_L \quad (2)$$

Q_L : 液流量 ($\text{L-liquid} \cdot \text{min}^{-1}$)

吸収効率 $\zeta = (P_i - P_o) / P_i$ で定義すると、(1) (2) は以下のように書き換えられる。

$$(P_i Q_G (T/V) \zeta - x) / y, \quad (P_i (Q_G / Q_L) \zeta - x) / y$$

いずれも送入オゾン濃度とガス流量で決められる数値となり、操作因子となることがわかる。

図5-21に、OD₄₁₀の減少を、単位TOC当りの消費オゾン量に対してプロットした。各々、原水のOD₄₁₀値を1.0としてある。図はガス流量をパラメータとしたものと、送入オゾン濃度をパラメータとしたものの両者を示してある。単位TOC当りの消費オゾン量に対しての減少量であるため、どの条件もほぼ同様な減少曲線を描いている。

図より約 $1 \text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ の消費オゾン量で、80~90%の除去が得られているが、黄色成分を示すOD₄₁₀値の場合、オゾン処理により消失しにくく、残存、もしくは他の着色成分が分解したことにより生成したことにより完全に除去できていないことがわかる。

一方、赤色成分を示すOD₅₅₀値の場合を図5-22に同様に示す。この成分では約 $1 \text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ の消費オゾン量で約90%以上が、どの条件の場合にも除去されていることがわかる。

BODに関する同様の関係を図5-23に示したが、いずれの場合も約 $1 \text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ で原水の約2倍となり、ほぼ平衡に達していることがわかる。

このように、色素成分、BODともに、消費オゾン量が約 $1\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ となる条件を達成することにより、妥当な除去、あるいは増加が認められることがわかる。

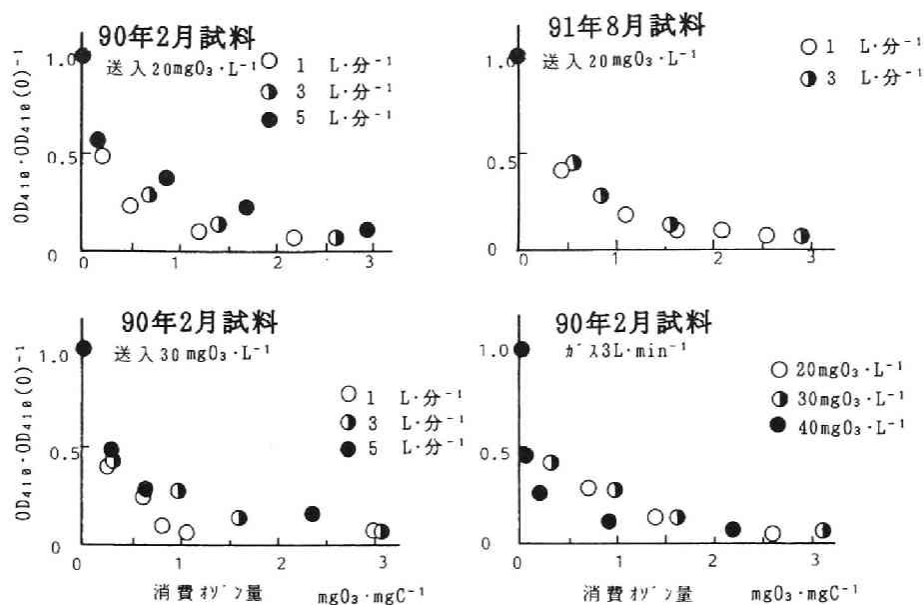


図5-21 消費オゾン量に対する OD_{410} の変化

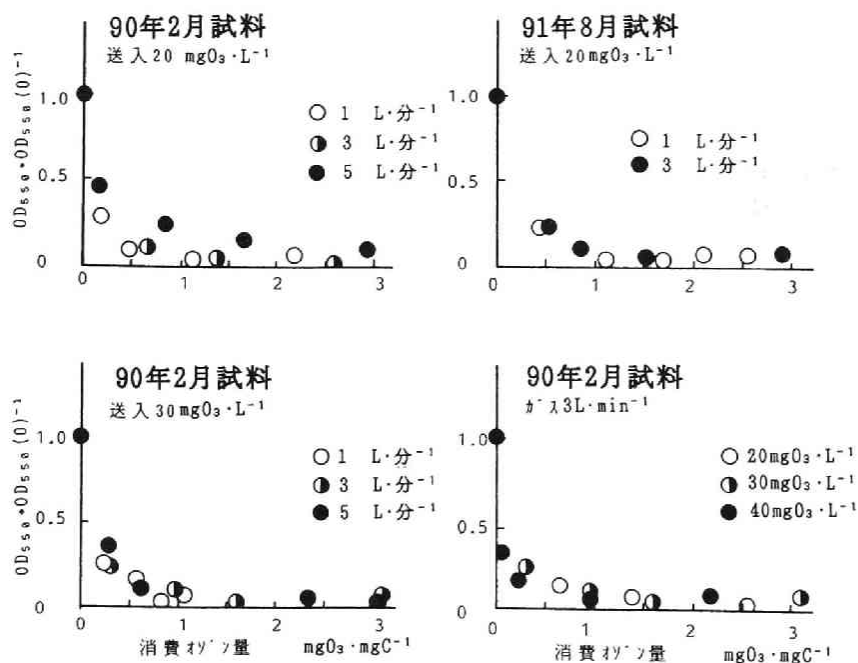


図5-22 消費オゾン量に対する OD_{550} の変化

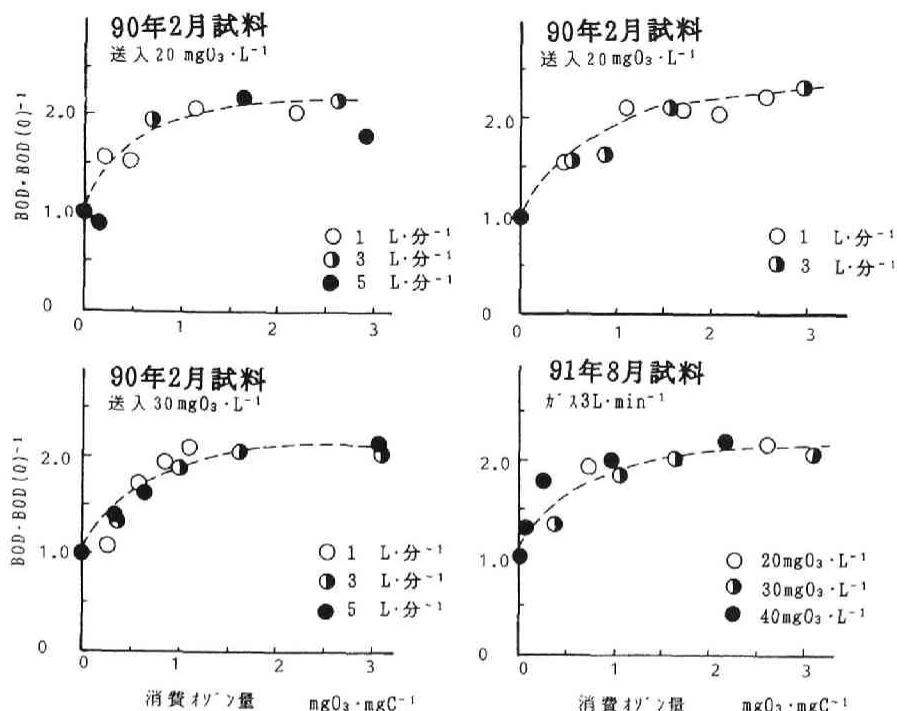
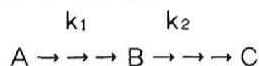


図5-23 消費オゾン量に対するBODの変化

3-3-2 色素成分、難分解性有機物分解のためのオゾン処理の解析

オゾン酸化は、水中に含まれるであろう有機物質に対して、比較的速く反応するものもあれば、緩やかに反応するものもあることが考えられている。ここでは宗宮、津野の実験的考察より得られた2段階反応をもとにした数理モデルを用い¹⁶⁾、UF膜処理水のオゾン処理による色素成分、難分解性有機物分解の解析を試みた。

対象となる有機物質として、高分子物質Aと、それが分解されて生成される低分子物質Bを考えた。この2段階反応が、



と考え、AがBに酸化分解されるとき、 α だけ無機化するとした。

これを物質収支式で示すと、

$$dL_A/dt = -k_1 L_A x \quad (3)$$

$$dL_B/dt = (1-\alpha)k_1 L_A x - k_2 L_B x \quad (4)$$

$$dL/dt = dL_A/dt + dL_B/dt \quad (5)$$

$$dx/dt = K_L a(x^* - x) - k_3 x + b(dL/dt) \quad (6)$$

- L_A, L_B ; A 及び B の有機物濃度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
 L ; 全有機物濃度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
 k_1, k_2 ; A 及び B の分解速度定数 ($\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)
 α ; 有機物の無機化率 (-)
 x ; 溶存酸素濃度 ($\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)
 x^* ; 飽和酸素濃度 ($\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$)
 K_{La} ; 総括物質移動容量定数 (hr^{-1})
 k_3 ; 自己分解定数 (hr^{-1})
 b ; 単位有機物除去当り消費される酸素量 ($\text{mgO}_3 \cdot \text{単位有機物}^{-1}$)

いま対象としているUF膜処理水の水質項目で、黄色成分を示す OD_{410} は、前述したようにオゾン処理により分解されるものの、黄色成分が副生成物として処理水中に生成されていく経験に鑑み、A、B 2成分の存在を仮定した。赤色成分を示す OD_{550} は比較的容易に分解されるものとして、A成分のみの減少と考えた。難分解性有機物がオゾン酸化され、易分解性となることで、BODが増加することが示された。ここでは難分解性有機物Aとし、BODで表される生物分解性有機物をBとする。

以下に諸係数値の決定の経過をまとめた。

BODに関しては、宗宮らの下水2次処理水中のCODcrのオゾン分解に関する実験より求められた諸係数値に準ずるとした¹⁶⁾。すなわち $k_1=8.4 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$, $k_2=0.084 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$ $b=3 (\text{mgO}_3 \cdot \text{mgCOD}^{-1})$, $\alpha=0.4$ である。

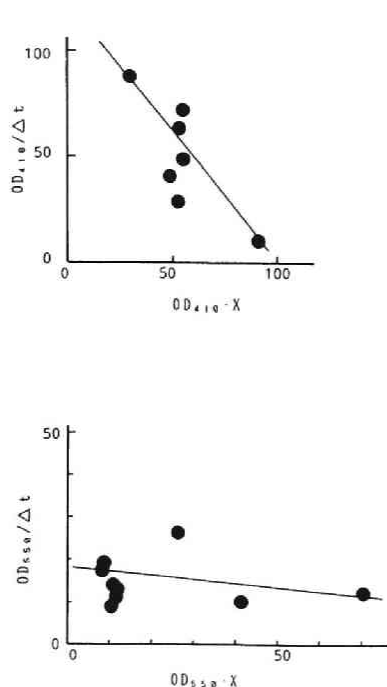


図5-24 K_1 の求め方

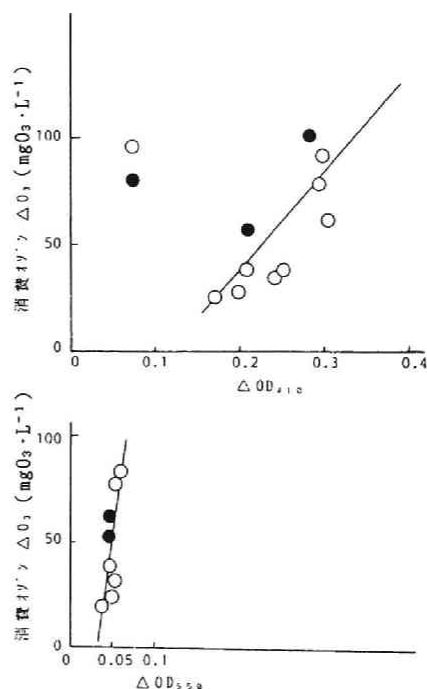


図5-25 b の求め方

OD₄₁₀、OD₅₅₀の k_1 は、式(3)より $\Delta L_a/\Delta t = -k_1 L_a x$ として $\Delta L_a/\Delta t$ と $L_a x$ をプロットし、その傾きより、各々の k_1 を推定した。図5-24に示す傾きより各々の k_1 が求められる。OD₄₁₀については $k_1 = 73.2 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$ 、OD₅₅₀に関しては $6 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$ が得られた。OD₄₁₀の k_2 は、CODcrの場合に準じ、 k_1 の1/100程度の値となとした。

単位有機物当りの消費オゾン量 b は、図5-25に示したように、OD₄₁₀、OD₅₅₀に関しては、本実験得られたデータより、各々 $460 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{410}^{-1})$ 、 $2800 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{550}^{-1})$ と求められた。

さらに x^* は送入オゾン濃度 $P_i (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1})$ と、分配係数 m' の積で表され

$$x^* = m' P_i \quad (7)$$

ここで $m' = -0.012\theta + 0.553$ θ ; 水温(°C)。

また $K_L a$ はガス流量 $Q_G (\text{L} \cdot \text{min}^{-1})$ の関数として表現され

$$K_L a = \gamma Q_G^{0.82} \quad (8)$$

本装置における実験値より、 $\gamma = 4.48$ を得た。以上の諸係数値を表5-9にまとめて記す。

表5-9 諸係数値

	BOD	OD ₄₁₀	OD ₅₅₀
b	$3 (\text{mgO}_3 \cdot \text{mgCOD}^{-1})$	$460 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{410}^{-1})$	$2800 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{OD}_{550}^{-1})$
k_1	$8.4 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$	$73.2 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$	$6 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$
k_2	$0.084 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$	$0.732 (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1})$	--
k_3	$0.174 (\text{hr}^{-1})$	$0.174 (\text{hr}^{-1})$	$0.174 (\text{hr}^{-1})$
α	0.4	0.4	--
x^*	$(-0.012\theta + 0.553)P_i (\text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1})$		
$K_L a$	$4.48 Q_G^{0.82}$		

そこで、本研究で得られた実験値に関し、これらの数値モデルを適用してみた。水温 $\theta = 13^\circ\text{C}$ 、送入オゾン濃度約 $20 \sim 40 \text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ 、ガス流量 $1 \sim 5 (\text{L} \cdot \text{min}^{-1})$ で実際の条件を数値モデル式群(1)~(4)に代入し、Runge-Kutta-Gill(RKG)法で差分計算を施した。RKG法は、きざみ幅の5乗の打ち切り誤差を有する公式である。したがってきざみ幅を小さくすれば極めて精度が高いが、誤差の式が複雑となり、計算に時間を要する。そこでいくつかの試算の結果、きざみ幅は0.01時間とし、30分間試算した。このようにしてOD₄₁₀、OD₅₅₀、BODの値を計算し、測定したデータとともに、図5-26~5-30に示す。これらの結果は、各実験における各水質間の相対的な変化をうまく表記しており、測定値との対応が十分でないケースがあるものの、おおよそのパターンが説明されている。

本実験で得られた諸係数値を用いて、回分式でのBOD、OD₄₁₀、OD₅₅₀及び溶存オゾン濃度の変化状態を、送入オゾン濃度 P_i をパラメータに試算した結果を図5-31に示してある。ここではガス流量 Q_G は $3 (\text{L} \cdot \text{min}^{-1})$ に設定してある。横軸に時間、縦軸は原水の値を1.0として、その比率を示してある。送入オゾン濃度が高いほど、色素成分の分解がすすみ、BODが増加することがわかるが、 $20 \text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ 以上では、その分解速度にほとんど差異のないことが示されている。また Q_G をパラメータにとった試算結果を図5-32に示してある。この場合は P_i を $20 \text{mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ に設定した。 Q_G の

増加とともに色素成分が分解され、BODは増加するが、 $3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 以上のガス量ではほぼ変化のことが図よりわかる。

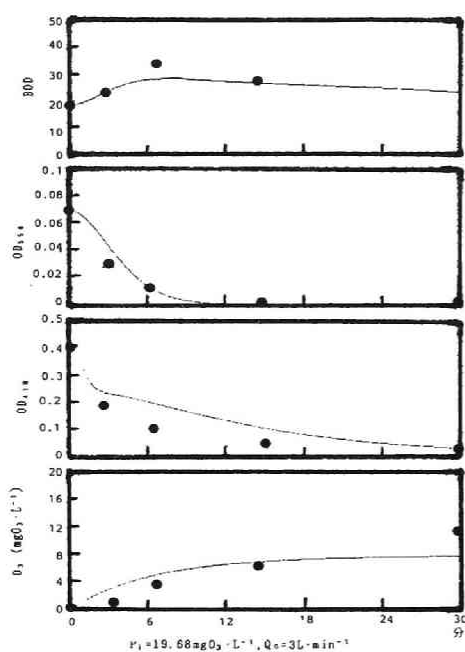


図5-26 シミュレーション結果

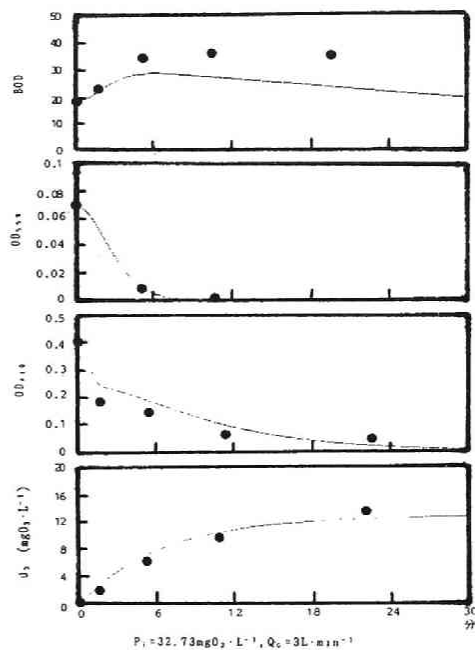


図5-27 シミュレーション結果

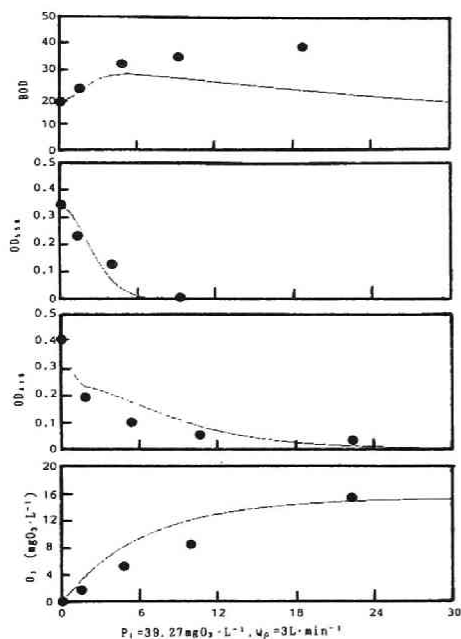


図5-28 シミュレーション結果

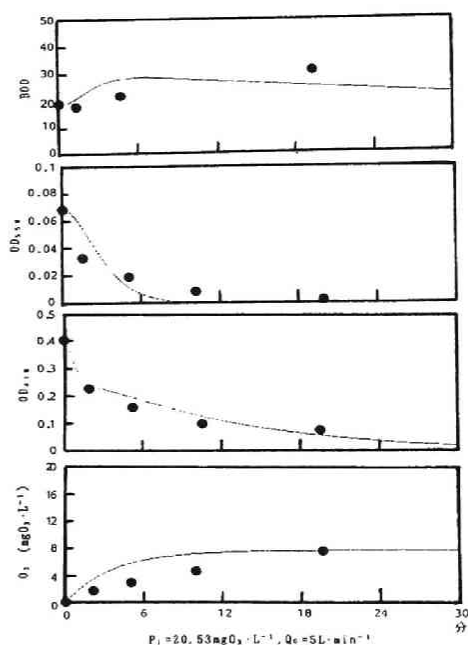


図5-29 シミュレーション結果

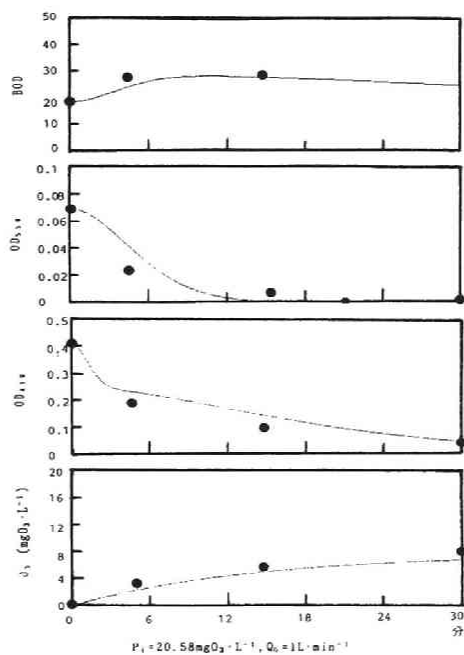


図5-30 シミュレーション結果

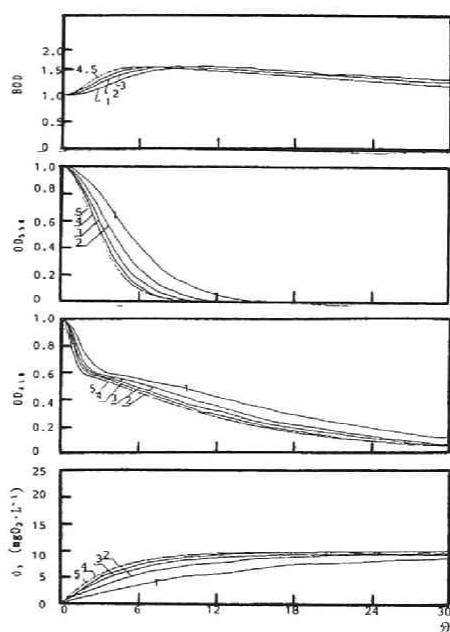
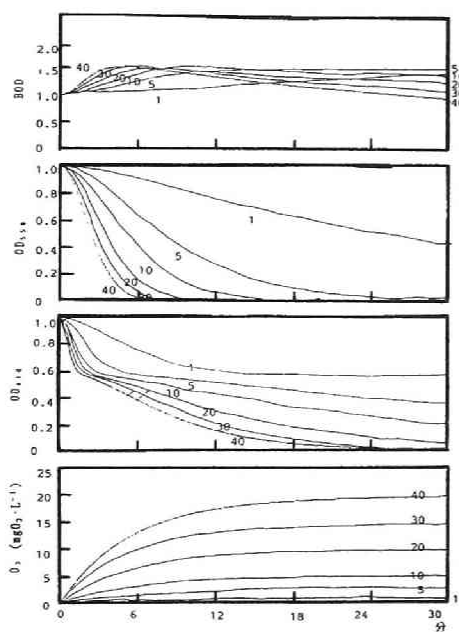


図5-31 送入オゾン濃度をパラメータとした試算結果 図5-32 ガス流量をパラメータとした試算結果

ここで連続向流接触筒における時間的定常条件下では、接触筒頭部よりZ(m)の位置△Zでのオゾンに関する収支式を宗宮、津野は以下のように表現している。ここでは以下の式にしたがって計算を実施してみた¹⁶⁾。

$$Q_L(dx/dz) = A \{ K_L a (x^* - x) - k_3 x \} + b Q_L (dL/dz) \quad (9)$$

$$Q_G(dP/dz) = A K_L a (x^* - x) \quad (10)$$

$$Q_L(dL_A/dz) = -A k_1 L_A x \quad (11)$$

$$Q_L(dL_B/dz) = A(1-\alpha) k_1 L_A x - A k_2 L_B x \quad (12)$$

$$Q_L(dL/dz) = Q_L(dL_A/dz) + Q_L(dL_B/dz) \quad (13)$$

境界条件 $z=0$; $x=0$, $L_A=L_{Ai}$, $L_B=L_{Bi}$, $L=L_i=L_{Ai}+L_{Bi}$

$z=H$; $P=P_i$

z ; 筒頂よりの位置 (m)

H ; 筒の高さ (m)

A ; 筒の有効断面積 (m²) $A=(1-\phi)A_0$

A_0 ; 筒の実断面積 (m²)

ϕ ; ホール・アッ? $\phi=0.930Va^{0.966}$ 0.96と設定した

Va ; ガス吹込速度 (m³/m²・min) $Va=Q_G/A_0$

P ; 気相中のオゾン濃度 (mg・L⁻¹)

以上の式群を用い、高さ方向に関して0.01mのザミ幅でRKG法で差分して計算した。

図5-33は $P_i=20$ mg・L⁻¹, $Q_G=0.3$ m³・hr⁻¹, Q_G/Q_L 比 = 10 の場合に関し、OD₄₁₀、OD₅₅₀及び有機物に関して計算した結果を高さ方向に示した。この結果よりOD₄₁₀に関しては約3mの高さでほぼ分解し、OD₅₅₀は約1mで、高分子有機物Aは約1mで分解していることがわかる。

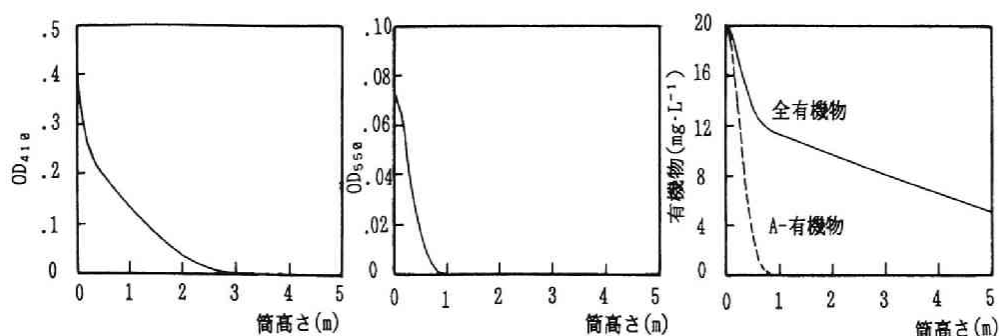


図5-33 筒高さに対する各項目の挙動

そこで図5-34には操作因子としてオゾン注入率を取り、各指標の残存率を理論的に試算した。この図より送入オゾン濃度及び流入水量の異なる処理操作に対して、この注入率で処理効率を把握できることがわかる。高分子有機物Aは3mgO₃・mg有機物でほぼ除去されている。この結果は宗宮ら¹⁶⁾のCOD除去に要するオゾン注入率の結果に一致している。OD₄₁₀については約400mgO₃・L⁻¹・単位OD₄₁₀⁻¹で、OD₅₅₀については約800mgO₃・L⁻¹・単位OD₅₅₀⁻¹で除去可能であることが示された。

さらに黄色を示すOD₄₁₀について、筒高さに対する分解に必要な単位OD₄₁₀当りのオゾン注入率を算出した。筒高さが高くなれば注入率は低くとることができる

ことが考えられる。図5-34にその結果を示す。筒高さを高くすれば注入率は減少し、だんだんと変化が鈍くなり、9~10mであまり変化がみられなくなる。この値は宗宮らの試算によるCODの除去のための最適筒高さ6~7m¹⁶⁾に比すと高いが、これはCODが高分子物質Aとされているのに比し、OD₄₁₀を高分子物質Aと2次産生物質Bの和で表しているためであると考えられる。この図から黄色成分OD₄₁₀を除去するためには筒高さを9~10mにとり、オゾン注入率を100mgO₃・L⁻¹・単位OD₄₁₀⁻¹前後で操作することが適当であることが結論できる。

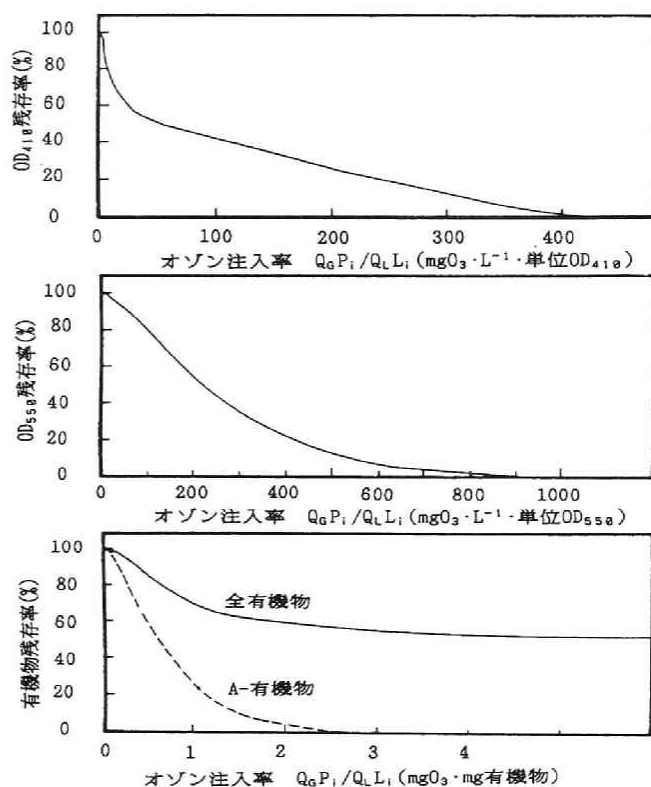


図5-34 オゾン注入率に対する各項目の残存率

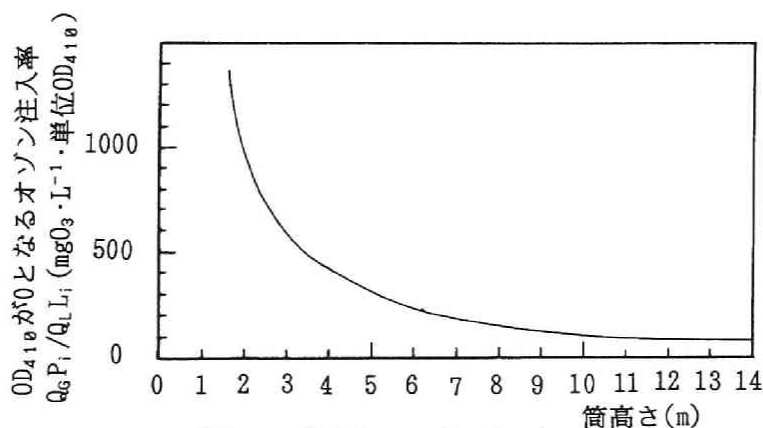


図5-35 筒高さとオゾン注入率

3-4 し尿中の遺伝毒性の検出とそのオゾン処理

3-4-1 C 処理場 U F 膜処理水

図5-36にはCし尿処理場の処理水濃縮成分の遺伝毒性結果を示した。この図からわかるように、し尿処理水中には+S9mix系で500~1000unitsとかなり強い遺伝毒性が存在することが確かめられ、この値は溶媒対照の最大約13倍の値を示している。このことは既に何人かの研究者による報告例があるが、人間の食物中に含まれているヘテロサイクリックアミンや、体内酵素や腸内細菌で生成される遺伝毒性物質が生し尿中に存在し、これが生物処理を経ても分解されにくく、なお多く残存していることを示している。Matsui¹⁸⁾は、Rec-assayによりし尿処理場の生し尿、凝集沈殿浮上分離液、オゾン・砂ろ過処理水について、DNA損傷性を検出している。いずれもXAD2/エーテル、XAD2/メタノールで比較的強いDNA損傷性を検出しているが、+S9mix系での差は強くみられない。これに対して本論で論じた遺伝毒性が+S9mix系でより強い誘発性をみたのは、原因物質がヘテロサイクリックアミンの仲間であるとすれば、P450酵素の存在する+S9mix系でより強く陽性反応が検出できたことは、それがアセチル化され、DNAを損傷する可能性があるという研究報告に符合している¹⁹⁾。

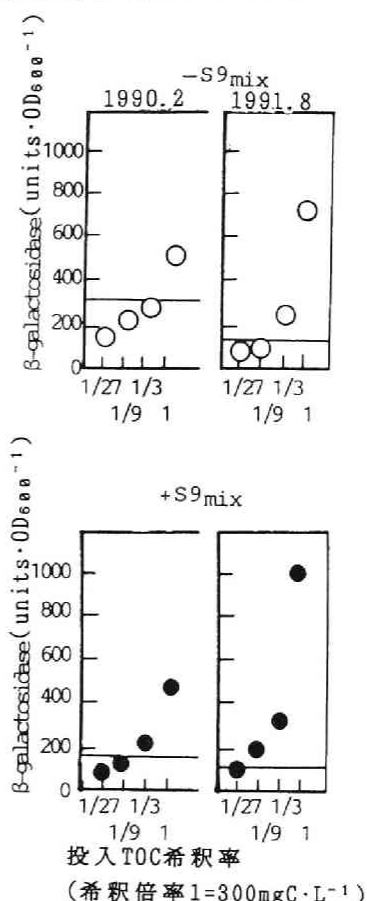


図5-36 C処理場処理水の遺伝毒性

3-4-2 D 処理場の処理方向における遺伝毒性の挙動

各試料における濃縮液のumuテストにおけるβ-galactosidase活性(units · OD550⁻¹)と、その判定結果を表5-10に示した。これらの表より、遺伝毒性陽性を示す試料が検出されることがわかる。しかも溶媒対照の3倍以上の強い陽性(++)を示す試料が多い。

しかしながら各試料とも濃縮倍率が異なり、これを①から⑧まで相対的にその有する遺伝毒性の大きさを検討することができない。そこで検出した遺伝毒性値Aを溶媒対照値B(溶解性成分の場合はDMSO、固形性成分の場合はエタノール)で除したA/Bを、各々の試料の濃縮倍率ηで除した値を算出した。この(A/B)/ηは、各試料を濃縮せずに原試料のまま試験菌株に投与した場合に呈するであろう遺伝毒性値を表している。実際には投与した有機炭素当りで算出すべきだが、濃縮過程での回収率が中途DMSOに溶解させたため不明確となり、全容量当りの濃縮値で算

出することとした。

図5-37に処理方向に2回採水した遺伝毒性値の-S9mix系に関する結果を表した。図より生し尿で固形物中に比較的多くの遺伝毒性物質が存在し、7月15日では溶解性成分における遺伝毒性の約4倍、7月16日では約10倍の強度が測定され、これはヒトふん便中に突然

変異原、あるいは発癌性物質が存在するという報告の通りであり、固形物すなわちふん便中に強い遺伝毒性が存在することが確かめられた。

この固形物中の遺伝毒性は、生物反応槽においてジクロメタ液抽出による濃縮は不可能であったものの、溶解性成分中の遺伝毒性をみる限り、生物反応槽—脱離液（固液分離）、脱水槽分離液においてはほぼ変化がなく、生物処理工程で除去

表5-10 各試料の判定結果

92.7.15. 試料	-S9mix β -galactosidase (units·OD ₅₅₅ ⁻¹)	判定	+S9mix β -galactosidase (units·OD ₅₅₅ ⁻¹)	判定
①生し尿溶解性	633	++	179	-
①生し尿固形物	370	++	307	++
②除さし尿溶解性	104		197	
③混合液溶解性	283		203	
④脱離液溶解性	438	++	363	++
⑤脱水分離溶解性	684	++	417	++
⑥凝沈上澄溶解性	192		102	
⑦砂ろ過溶解性	172		69	
⑧活性炭溶解性	158		91	
溶媒対照	148		115	

92.7.16 試料	-S9mix β -galactosidase (units·OD ₅₅₅ ⁻¹)	判定	+S9mix β -galactosidase (units·OD ₅₅₅ ⁻¹)	判定
①生し尿溶解性	348	+	444	++
①生し尿固形物	161		88	
②除さし尿溶解性	858	++	671	++
③混合液溶解性	711	++	654	++
④脱離液溶解性	991	++	817	++
⑤脱水分離溶解性	962	++	770	++
⑥凝沈上澄溶解性	371	++	193	
⑦砂ろ過溶解性	243	-	214	
⑧活性炭溶解性	246		212	
溶媒対照	142		118	

されていないか、あるいは若干増加している。これは固形物中に存在した遺伝毒性成分が溶液中へ溶解したことによるのかもしれない。

この遺伝毒性は結局凝集沈殿で溶液中から約90%除去され、ついで砂ろ過処理によりさらに50%減じることができる。砂ろ過後の活性炭処理はほとんど効果がみられない。

図5-38には、+S9mix系での同様の処理方向の遺伝毒性値を表した。遺伝毒性は両日とも-S9mix系で得られた値とほぼ同等の値が得られており、また生し尿固形物中にも溶解性成分に比し、約5から10倍の遺伝毒性成分がある。とくにふん便中でのP450酵素群による代謝活性系で活性化されて遺伝毒性を示すような物質の存在が示唆される。処理方向へは-S9mix系と同様、生物処理工程においては、ほとんど除去されず、凝集沈殿処理で90%以上の除去が得られ、砂ろ過処理でさらに50%以上除去される結果となっている。

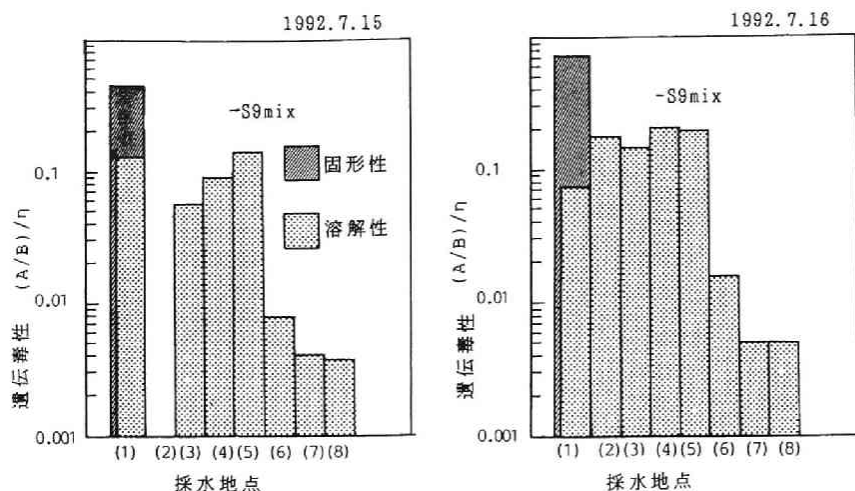


図5-37 D処理場処理方向における遺伝毒性(-S9mix)

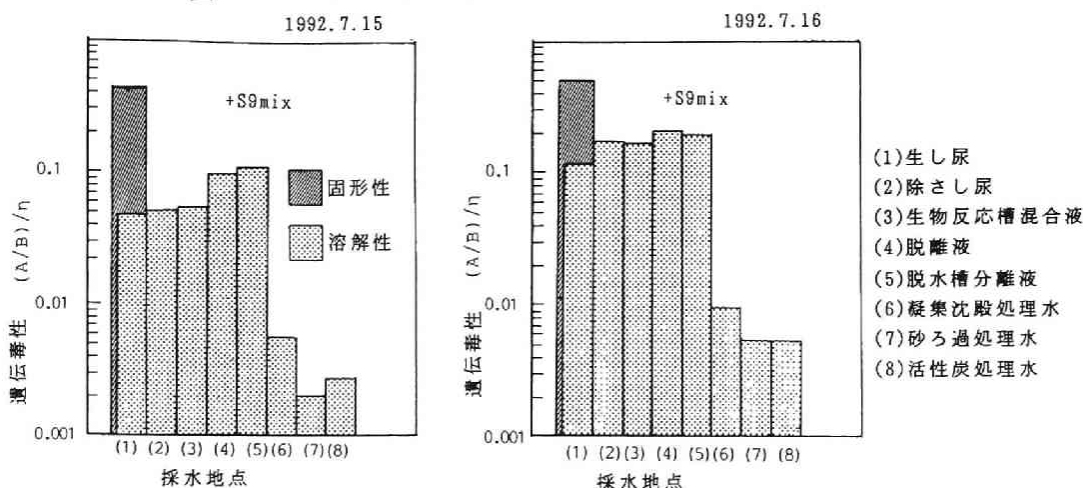


図5-38 D処理場処理方向における遺伝毒性(+S9mix)

このように、生し尿、とくにその中でも固形物（ヒトふん便）中に存在した遺伝毒性成分は、生物処理工程にはほとんど除去されない生物難分解性物質であることが示唆され、このような物質の水環境中への放出を制御するための方策が必要であると考えられる。

3-4-3 遺伝毒性物質のオゾン処理による除去

生物処理で除去が困難な遺伝毒性物質の除去のためにオゾン処理の適用を考えた。オゾン処理は前項でも示したように、色素、及び難分解性有機物の分解には有効であることがわかっている。

図5-39にはC処理場UF膜処理水の含有有機炭素当りの消費オゾン量に対する、各々の試料を濃縮したもののumuテスト結果を図示してある。この遺伝毒性は、消費オゾンの増加とともに減少していき、2つの採水日の試料ともに約 $1\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$

¹の消費オゾンでいずれも陰性となることが認められた。Matsui¹⁸⁾もし尿中のRec-assayによる低減効果を述べており、オゾン酸化の有用性が認められる。

以上のように、処理水中に残存している遺伝毒性物質は、比較的高い値が検出され、人間由来の遺伝毒性物質が水環境中へ放出される可能性のあることがわかったが、それらはオゾン酸化により除去可能であることがわかり、処理水への高度処理の適用など、丁寧な処理の必要性が示唆される。

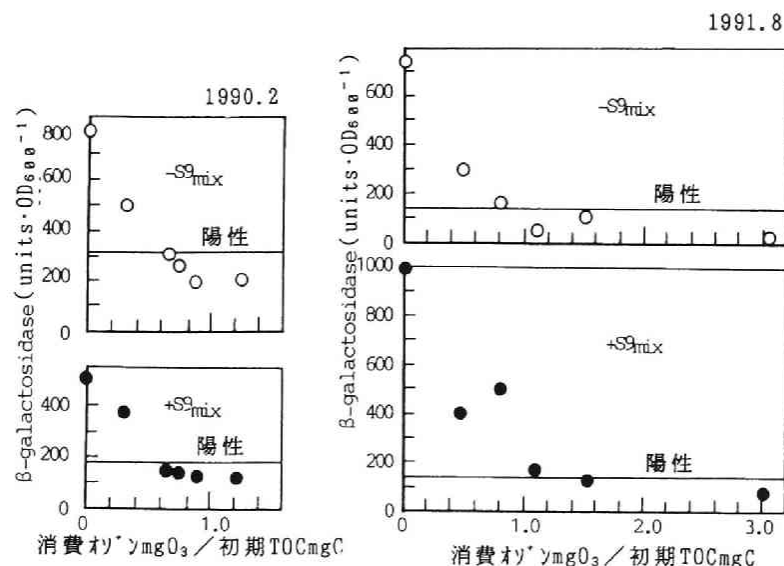


図5-39 C処理場処理水中遺伝毒性のオゾン処理

3-5 まとめ

本節ではし尿処理場の試水に対し遺伝毒性試験を行い、ヒト由来の遺伝毒性物質の挙動を検討し、あわせてそのオゾン酸化による消長の効果を検討した。以下に本研究の成果を箇条書に示す。

- ①色素成分の黄色、及び赤色は単位有機炭素当り1単位のオゾン ($1\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$) でほぼ消失する。但し、黄色成分に関しては色素の分解の過程で生成されるものもあり、完全には消失し得なかった。
- ②試水をオゾン酸化することにより、その生物分解性が上昇する指標としてBODの変化を測定したが、約 $1\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ の消費オゾン量で原水の約2倍のBOD値となり、後処理工程としての生物処理により有機物除去が可能となることを示した。
- ③送入オゾン濃度とガス流量をパラメータとした実験的検討より、色素成分、BOD、溶存オゾンの数値モデルにより各々の分解定数などが求められた。これにより操作条件による処理効率の評価が可能となった。
- ④数値モデルを用いた試算結果より、し尿膜処理水のオゾン処理にあっては、オゾン注入率を操作因子として、また筒高さを設計因子として色、及び有機物の分解効率に関する知見が得られた。
- ⑤生物処理を施した後の処理水中には強い遺伝毒性物質が検出できた。この成分

は、生し尿の特に固形物中に多く存在すると考えられ、生物処理、固液分離、脱水工程を経るに従い、液中に遺伝毒性物質が多く溶出する傾向がみられる。この遺伝毒性は、凝集沈殿工程で約90%除去できることがわかった。このように生物処理のみでは、人間由来のし尿中に存在する遺伝毒性成分は分解しがたく、高度処理の必要が示唆される。

⑥この遺伝毒性を除去するための高度処理法として、オゾン処理の効果を検討した。生物処理後、UF膜でろ過した試料の有する有機炭素当りの消費オゾン量で約 $1\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ でSep-pak吸着-メタノール抽出画分中の遺伝毒性は消失した。

第4節 結語

本章では水環境に流入する試料として、下水処理場及びし尿処理場の処理水を対象として、umuテストで遺伝毒性を検討した。以下に成果をまとめて記す。

①都市下水の濃縮成分を、umuテストに適用したところ、遺伝毒性陽性はSep-pakのメタノール画分で強く検出され、特に+S9mix系でより強く検知された。このことは都市下水処理水中に残存している有機物中には遺伝毒性を示す様な成分が含まれていることを示すとともに、Sep-pakC₁₈樹脂によりそれら有機物の回収が可能であることを表している。またSep-pakはカートリッジ型で扱いが簡便で、現場での濃縮にも適していることがわかった。

②このような遺伝毒性を示す成分は、曝気槽流入水中にも検出できたが、+S9mix系で約1/7と、生物処理過程である程度減少していることがわかったものの、調査した処理場で一週間通して処理水中に検出され、日常的に都市下水中に流入する可能性のある有機物に由来していることが示唆された。

③この遺伝毒性成分を除去するために高度処理の導入が必要であると考えが、ここではオゾン酸化によりその除去を検討した。遺伝毒性成分は、処理水の有する有機炭素量に対する消費オゾン量で、約 $0.5\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ で消失しうることがわかった。

④そこでこの遺伝毒性を有する成分がヒト由来のふん便中に存在する成分である可能性を考え、し尿処理場における調査を実施した。

色素成分の黄色、及び赤色は単位有機炭素当り1単位のオゾン($1\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$)でほぼ消失することが得られた。実験的に得られた反応定数を適用した数理モデルを用いた解析により、オゾン酸化による色素成分分解のための操作・設計因子の検討が可能となった。

⑤生物処理を施した後の処理水中には強い遺伝毒性物質が検出できた。この成分は、生し尿の特に固形物中に多く存在すると考えられ、生物処理、固液分離、脱水工程を経るに従い、液中に遺伝毒性物質が多く溶出する傾向がみられる。この遺伝毒性は、凝集沈殿工程で約90%除去できることがわかった。このように生物処理のみでは、人間由来のし尿中に存在する遺伝毒性成分は分解しがたく、高度処理の必要が示唆される。この遺伝毒性を除去するための高度処理法として、オゾン処理の効果を検討した。生物処理後、UF膜でろ過した試料の有する有機炭素

当りの消費オゾン量で約 $1\text{mgO}_3 \cdot \text{mgC}^{-1}$ でSep-pak吸着-メタノール画分の遺伝毒性は消失した。

引用文献

- 1) 米国環境保護庁編(1988): 飲料水中の各種化学物質の健康影響評価、日本水道協会、444-456
- 2) 米国環境保護庁編(1988): 飲料水中の各種化学物質の健康影響評価、日本水道協会、489-497
- 3) 米国環境保護庁編(1988): 飲料水中の各種化学物質の健康影響評価、日本水道協会、407-416
- 4) 黒木登志夫(1989): がん細胞の誕生、朝日選書、43-47
- 5) 真野ら(1991): 胆汁中の突然変異性の検討による胆道ガンの成因研究、環境変異原研究、13(2)、0-19
- 6) 西村編(1985): 発がん、化学同人、12-15
- 7) 西村編(1985): 発がん、化学同人、p22
- 8) 早津彦哉(1989): 都市域の環境中における健康影響因子の評価と制御に関する新技法の開発、日本生命助成研究ワークショップ、p16
- 9) 田中ら(1992): 好気性ろ床及びオゾン処理による下水の高度処理、第1回日本オゾン協会研究講演会講演集、207-210
- 10) 竹田(1992): 下水2次処理水のオゾン処理、同上、211-214
- 11) 加治ら(1992): オゾン・活性炭による下水の高度処理、同上、215-218
- 12) 山内ら(1992): 2次処理水のオゾン処理に関する調査、同上、223-226
- 13) 中室、佐谷戸ら(1990): 水中変異原物質の濃縮方法とその検出に関する一考察、第24回水質汚濁学会講演集、405-406
- 14) 亀井、丹保、田村(1985): 塩素及びオゾン処理によって水中のフミン質類から生成する成分の環境変異原性、水道協会雑誌、614、25-33
- 15) 浦野、金沢(1990): 水中微量有機物の濃縮回収と変異原性、第24回水質汚濁学会講演集、403-404
- 16) 宗宮功、津野洋(1975): 連続向流接触筒による二次処理水のオゾン処理に関する研究(II)、水処理技術、16(8)、725-737
- 17) 宗宮功編著(1989): オゾン利用水処理技術、公害対策技術同友会、142-148
- 18) Masui, S. (1988): The Bacillus subtilis/Microsome Rec-assay for the Detection of DNA-damaging Substances in Waters of a Night Soil Treatment Plant, Toxicity Assessment: An International Journal, 3, 173-193
- 19) 小田美光(1992): umuテストによる変異原性の検出、第26回日本水環境学会講演集、p502
- 20) Ono, Y., Somiya, I., et. al. (1992): Genotoxicity of organic substances in municipal sewage and its ozonated products, Water Science & Technology, 25(11), 285-291
- 16) 小野芳朗、宗宮功(1993): 下水処理水中の難分解性有機物の遺伝毒性に関する研究、下水道協会誌論文集、38(356)

- 17) 小野芳朗、宗宮功、河村正純 (1990) ;都市下水処理水中の遺伝毒性物質のオゾン処理による分解に関する研究、環境変異原研究、12 (2)
- 18) 小野芳朗、宗宮功、川口達也 (1992) ;都市下水処理水の遺伝毒性に関する研究、日本環境変異原学会要旨集、p104

第6章 終論

本研究では水質の高度化にともない着目されてきている水環境中の微量有機物の安全性を、遺伝毒性を指標として評価を進めた。発癌性に相関があるといわれる遺伝子上の毒性を検索するバクテリアを用いた既開発の遺伝毒性試験に対してその適用の簡便、迅速さを図るための実験手技の検討を行い、さらに試験法の測定条件の把握のため、遺伝毒性発現の現象を把握しようとした。さらには水環境中の有機物質、消毒に関わる副生成物や、農薬、染料の原料物質の遺伝毒性を検討するとともに、その評価法を示した。さらに本研究で検討してきた試験法を現場の試料に適用する際の有機物回収と毒性検知に関して考察を実施した。以下に各章毎に成果をまとめ、最後に本研究で得られた結論の特色をまとめて記す。

第1章では、化学物質による発癌、突然変異の誘発が指摘される背景を述べるとともに、遺伝毒性を水環境で指標として取り上げていく意義、及びその問題点を指摘した。とくに混合試料である水環境試料が、その中のどの有機物を対象に変異原性を検出していくのかを設定することにより、濃縮の技法、回収法、及び変異発現の機構を理解しての毒性試験法の採用と、内外の研究者による展開を概観した。これにより本研究で適用していく遺伝毒性試験法や試料の濃縮法の位置付を明らかにしようとした。

第2章では、小田らによって開発された遺伝毒性試験法である*umuC*細菌を使った*umu*テストを水環境試料に適用するための簡便化、迅速化を検討し、さらに誤りがちなDNA修復をなす*umuDC*遺伝子の誘発に関する現象より本試験法の有用性を検証し、その測定条件を明確化することを試みた。得られた成果を以下にまとめる。

①バクテリアの課題であるテストの簡易化を検討し、培養時の振とう数の決定、細胞膜破碎への界面活性剤SDSの適用で迅速に結果を得ることができるようになった。

②化学物質の種類、濃度により陽性反応の現れ方に差異のあることが観察された。塩素処理生成物とされる*m-ジクロロベンゼン*、*クロホルム*、*ブロホルム*、そしてオゾン処理生成物とされる*ホルムアルデヒド*、*グリオキサール*さらに*m-クロフェノール*をモデル物質として、適当な濃度を与え、経時的に菌体濃度、*umuDC*遺伝子量、*dehydrogenase*活性量、ATP量などの変化を測定した。この結果、DNAの修復のために一時的に細胞分裂を停止している細胞の遅滞期は、化学物質により異なり、しかもその長さは*dose response*を示した。同様に*umuDC*遺伝子の誘発量を表すβ-galactosidase誘発速度にも物質により差異が認められ、*dose response*が示された。

③*ブロホルム*、*m-ジクロロベンゼン*の細胞内外での挙動と、*umuDC*遺伝子の誘発を経時的に検討した結果、*ブロホルム*の場合にはそのままの形で細胞内に摂取され、1 cellに 10^8 molecules程度の量が摂取されたときに*umuDC*遺伝子の誘発が観察できた。*m-ジクロロベンゼン*は細胞外でその形を変えて摂取され、DNAを損傷していることが推察された。この経時的な変化において、DNA修復のために*umuDC*遺伝子が誘発されている間は蓄積されたエネルギー源であるATPがDNA修復のために消費され、修復終了時に再度基質分解、ATP蓄積、そして細胞の再増殖がみられることがわ

かった。

④プロモホルム、*m*-ジクロロベンゼンによってumuDC遺伝子の誘発がみられた菌株は、DNA上に塩基対交換の突然変異を生起しているとともに、ストレスを与え続けると、菌株は耐性を有し、変異を有したまま生存することと考えられる。この観点から化学物質のストレスを与えて、増殖阻害が起こり、その間umuDC遺伝子が誘発されたのち、再増殖した菌は、突然変異をDNA上に有した菌であり、遺伝毒性的にみれば危険度が増しているとみなせる。

⑤本試験法には小田らの開発した標準法に対して本研究を通しての検討の結果、水環境化学物質に適用する際に、以下の諸点を添加すべきであると考ええる。

- a) 被検化学物質の示した酵素活性量をA、溶媒対照をBとすれば遺伝毒性強度は(A-B)/Bで表示しうる。
- b) 化学物質の投与に際し、再現性のために初期菌体量を試験を通して一定とすること、つまり化学物質の試験菌株に対する負荷量は統一することが望ましい。
- c) 化学物質の投与量は負荷量表示とし、濃度表示に併記することとした。
- d) 反応2時間の標準データは測定する必要があるが、増殖阻害がみられた場合、反応をovernightで実施する系を作り、細胞が死に至ったのか、あるいは再増殖したのかを確認する必要があると考える。

第3章では、浄水、下水の消毒に使用される塩素処理、あるいはオゾン処理により生成する化学物質に関して遺伝毒性について検討した。ここで両酸化法による副生成物は、極性の相違から濃縮法が異なること、どの分画に遺伝毒性活性があるかを同定する必要があることを勘案し、既に同定された副生成物に関して、代表的なものを各々遺伝毒性を評価していく方が簡便、かつ迅速な結果が得られるとの立場から遺伝毒性試験を実施した。本章での結果により両化学酸化処理での副生成物に関する遺伝毒性の評価に新たな「遺伝毒性指数」を導入し、定量的な情報を与えることが可能となった。

まず一次スクリーニングとして、バクテリアアッセイであるumuテストを各々の化学物質に適用した。

①塩素処理生成物とされる化学物質19種中、菌体と化学物質との反応時間2時間で陽性を示した物質は以下の通りである。

-S9mix *m*-ジクロロベンゼン、1,2,4-トリクロロベンゼン、プロモホルム

+S9mix *m*-ジクロロベンゼン、ジクロロ酢酸、トリクロロ酢酸、クロール

②オゾン処理生成物とされる化学物質18種中、反応時間2時間で陽性反応を呈したものを以下に示す。

-S9mix ホルムアルデヒド、イオン

+S9mix ホルムアルデヒド、フルワール、カルボン、グリオキサール、アクロレイン

③遺伝毒性の強さを表す指標として、前章で検討したように化学物質の投与量は、細胞への負荷量表示で表した方が望ましいとの考え方から、各化学物質の陽性を示した最小の、1細胞当りの化学物質の投与分子数を計算し、これを「遺伝毒性指数」と定義した。この遺伝毒性指数が小さいほど遺伝毒性の強い化学物質であることが示される。被検化学物質は $10^9 \sim 10^{10}$ molecules・cell⁻¹で陽性を示した。検討した化学物質中では、-S9mix系ではプロモホルムが、+S9mix系ではジクロロ酢酸、トリ

クロ酢酸、クロールが比較的強い遺伝毒性物質であることがわかった。

④試験菌株と化学物質との反応時間を2～24時間と比較的長くとることで、陽性に転じた、あるいは陽性反応でもその遺伝毒性強度をさらに増した物質を検索した。以下に示す。

- S9mix; クロホルム、トリクロエチレン、テトラクロエチレン、グリオキサール、イオン
- +S9mix; m-ジクロロベンゼン、ブロホルム、クロホルム、アセチルアセトン、イオン、アクリレン

次に細菌細胞での遺伝毒性試験において陽性を示した化学物質を、二次スクリーニングとして哺乳動物細胞を用いたCHL/IU細胞で染色体異常誘発性を検討した。結論を以下に示す。

⑤塩素処理生成物中、陽性を示したのは、クロホルム、1,2,4-トリクロロベンゼン、m-ジクロロベンゼン、ジクロ酢酸、トリクロ酢酸及びクロールであった。またオゾン処理生成物では、ホルムアルデヒド、フルワール、グリオキサール、カルボン、及びイオンが陽性と判定できた。この中で染色体異常誘発率が陽性であり、かつ細胞の増殖が認められる化学物質は、クロホルム、m-ジクロロベンゼン及びグリオキサールであった。

⑥染色分体切断型の異常は、クロホルム、ジクロ酢酸、クロール、ホルムアルデヒド及びイオンに多くみられた。また大きな損傷として考えられる交換型の異常は、クロホルム、ホルムアルデヒドに比較的多く観察できた。

⑦遺伝毒性指数による誘発性の表現により、トリクロ酢酸と、イオンが強い誘発性を示すことが表された。またホルムアルデヒドよりもクロホルムが若干強い誘発性を示していた。各々の指数は $10^{11} \sim 10^{14}$ molecules \cdot cell $^{-1}$ で細菌細胞での値に比し、 $10^2 \sim 10^4$ 倍であった。

第4章では化学物質の遺伝毒性評価を、化学物質の持つ構造がDNA損傷に影響を及ぼすであろうとの知見から、構造因子により推定することを試みた。次にこのようなバイオアッセイによる遺伝毒性試験の結果からリスク管理の場への適用性を検討するために、確率モデルを適用し、飲料水中のリスク評価を実施している。以下に得られた成果をまとめる。

①芳香族有機塩素化合物クロロベンゼン、クロフェノール、クロロトロベンゼン、クロアニリン、クロトルエン、クロ安息香酸、クロアルデヒドの有する遺伝毒性強度と、それらの構造因子間の相関を検討した。構造因子には塩素置換基数(Nc)、親水性及び疎水性の指標となる溶解度(Ws)、複雑な立体効果を表す融点(F)、及び電子的効果を表すHammettの置換基定数($\Sigma \sigma$)を採用した。その結果、クロフェノール類にこれら構造因子との比較的強い相関性がみられた。

②クロフェノール類に対して、上記構造因子に加え、疎水性の指標であるn-オクタノール/水分配係数(logPow)、酸解離定数(pKa)、分子の立体効果の指標である原子価分子結合性指数($^1\chi^v$)、及び分子の有効断面周囲(ΣD)と遺伝毒性強度(A-B)/Bの相関を求めた。その結果、クロフェノール類の遺伝毒性強度は、細胞膜透過に係わるlogPow、及びDNAの結合に関与していると考えられるNc、F、 $\Sigma \sigma$ 、 $^1\chi^v$ 及び ΣD に高い相関性を示した。とくにDNAの損傷に関わるような化学物質の立体構造に関する因子が高い寄与率を有していた。これらの解析により、上記異性体の遺伝毒性をその構造より推定することが可能となったと考えられる。

③モデル化学物質群に対し、それらの有する遺伝毒性が無閾値反応であるとして、その飲料水中における実質安全用量を評価しようと試みた。ブロム化、クロロ化、m-ジクロロベンゼン、ホルムアルデヒド、グリオキサール、m-クロフェノールのumuテスト結果に対し、確率モデルとしてOne-hit multi-target modelを適用し、その適合性を確かめた。

④実質安全容量VSDの試算のために、 10^{-6} の危険率で試算した。そしてヒト1細胞当りの実質安全用量式を呈示した。この式を用い、1日2Lの飲料水を成人が生涯70年間摂取するとき、全細胞で遺伝毒性の生起する用量は、各モデル物質で $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ で小数点以下1桁から以上1桁の範囲にあることが試算できた。これはUS EPA Health Advisoriesにおける有機塩素化合物の発癌性に関する生涯実質安全用量とオーダーで一致しており、umuテストとOne-hit modelによる試算がリスク評価に適用可能であると考えられた。

第5章では実際に水環境に流入する試料として、下水処理場及びし尿処理場の処理水を対象として、umuテストで遺伝毒性を検討した。以下に成果をまとめて記す。

①都市下水の濃縮成分を、umuテストに適用したところ、遺伝毒性陽性はSep-pakのメタノール画分で強く検出され、特に+S9mix系でより強く検知された。このことは都市下水処理水中に残存している有機物中には遺伝毒性を示す様な成分が含まれていることを示すとともに、Sep-pakC₁₈樹脂によりそれら有機物の回収が可能であることを表している。またSep-pakはカートリッジ型で扱いが簡便で、現場での濃縮にも適していることがわかった。

②このような遺伝毒性を示す成分は、曝気槽流入水中にも検出できたが、+S9mix系で約1/7と、生物処理過程である程度減少していることがわかったものの、調査した処理場で一週間通して処理水中に検出され、日常的に都市下水中に流入する可能性のある有機物に由来していることが示唆された。

③この遺伝毒性成分を除去するために高度処理の導入が必要であると考え、ここではオゾン酸化によりその除去を検討した。遺伝毒性成分は、処理水の有する有機炭素量に対する消費オゾン量で、約 $0.5 \text{ mgO}_3\cdot\text{mgC}^{-1}$ で消失しうることがわかった。

④そこでこの遺伝毒性を有する成分がヒト由来のふん便中に存在する成分である可能性を考え、し尿処理場における調査を実施した。ここでもそれらの除去にオゾン酸化の適用性を検討したが、生物処理を施した後に残存している色素成分の除去のために、実験による理論式を適用し、その除去のための操作・設計因子を検討できた。

⑤生物処理を施した後の処理水中には強い遺伝毒性物質が検出できた。この成分は、生し尿の特に固形物中に多く存在すると考えられ、生物処理、固液分離、脱水工程を経るに従い、液中に遺伝毒性物質が多く溶出する傾向がみられる。この遺伝毒性は、凝集沈殿工程で約90%除去できることがわかった。このように生物処理のみでは、人間由来のし尿中に存在する遺伝毒性成分は分解しがたく、高度処理の必要が示唆される。この遺伝毒性を除去するための高度処理法として、オゾン処理の効果を検討した。生物処理後、UF膜でろ過した試料の有する有機炭素当りの消費オゾン量で約 $1\text{mgO}_3\cdot\text{mgC}^{-1}$ で遺伝毒性は消失した。

以上のように各章毎に得られた成果を再度整理し、遺伝毒性に関する本研究の特色を明確にする。

第一点として、遺伝毒性検出のためのバクテリアアッセイ umuテストの適用性の問題である。これは開発された標準法を水環境試料に適用していく際の測定条件に係わる検討を実施している。主として第2章で検討したが、umuテストはDNA上の突然変異を左右するSOS修復機構による試験法であること、そのためのumuDC遺伝子を直接測定していること、そして液体培養であるがために水環境試料に適用して濃度表示が可能であることなどの利便性を有している。実際に他に多用されているAmes試験は突然変異した現象を測定しているが、結果が得られるまでに2日間を要するし、また反応が特異的であるため複数の菌株を必要とする。これに対し、umuテストがその遺伝子の誘発により突然変異が生起していることが確かめられ、単菌株での結果の迅速処理という遺伝毒性のバクテリアアッセイとしての要件を十分に満たすことを述べてきた。そしてDNA塩基対に対して化学物質が分子レベルで作用することに鑑みて、単位細胞に対する化学物質の投与分子数という「遺伝毒性指数」を提唱し、これを評価の基礎単位とした。

第二点は第4章中で述べたように、遺伝毒性の定量評価として遺伝毒性指数の考え方をを用いて遺伝毒性の実質安全濃度を算出し、その値の発癌性試験での結果と比較することにより、umuテストのリスク評価への適用性を示し得たことである。このことは生物試験法による遺伝毒性の検出の次元から、その化学物質の制御への情報を提供する評価法を検討したこととなる。

第三点は水環境中に存在するとされる化学物質群に対してアッセイを適用し、その遺伝毒性の強さを、上記の指数をもって評価しようとした。これは第3章と第4章、第5章の中で取り上げているが、まず対象に消毒のための化学酸化処理、塩素処理とオゾン処理の副生成物をターゲットとした。これらの遺伝毒性評価は、有機塩素化合物を生成する塩素処理工程に変わる消毒・酸化処理法として近年わが国でも適用が広がる兆候を見せているオゾン酸化の、塩素消毒に対する安全性の評価のニーズを背景に有している。本研究では極性の異なる両化学酸化処理生成物の比較を同定された化学物質を遺伝毒性指数で表すことにより、定量化したところに特徴がある。また農薬、染料の原料となる芳香族有機塩素化合物の一連の物質群を、その異性体の有する構造因子により遺伝毒性への影響を推定することが可能となった。さらには実際の水試料にまで本試験方法を適用することができた。

第四点は第5章中で示した様な、遺伝毒性試験を水環境試料に適用する際の最大の問題点となる濃縮・回収法につき検討を加えたことである。本研究中では下水とし尿の生物処理水を対象に、現場で、迅速で扱いが簡単であり、かつ目的とする遺伝毒性成分の回収が可能である吸着樹脂を駆使している。

第五点は、同章中で、生物処理で残存する遺伝毒性成分に対しオゾン処理の有効性を示し得たことである。これは水質の高度化、親水空間での再処理水の利用が頻繁になるにつれ、潜在化している微量有機物の安全性の確保のために必要な高度処理法の導入を示唆したものとなっている。

一方、本研究で扱った水環境試料の遺伝毒性に関して今後に残る課題を以下に簡単にあげる。

第一点は、水環境試料のような混合試料中の遺伝毒性を如何に正確に把握するかという問題である。これは2つのトレンドがあると考えられる。1つは混合試料中の遺伝毒性を全体的に捉えるために、効果的な濃縮・抽出・分画法を適用していく方法である。これは各種の濃縮法の開発に力点がおかれることになるが、一方、抽出された遺伝毒性を示す物質は何か、という問いには煩雑な同定操作と、たとえ同定できたとしても複合効果を考えると、遺伝毒性の効果を決定的に表しがたい面がある。もう一つの方向は、近年の環境変異原学会で進行している特定のDNA損傷を誘導するに至る酵素系を、アッセイ中に組み込み、それをもって混合試料中の特定の物質群の存在を同定し、同時に変異原性を評価しようとするものである。たとえば、ニコチン還元するニコ還元酵素、芳香族アミンをメチル化するO-7メチル転移酵素を産生する遺伝子を組み込んだAmesテストYGシリーズの開発（国立衛試験能美ら）、umuテストNMシリーズの開発（大阪府公衛研 小田）、アルキル化剤による修復欠損株 *ada*遺伝子の導入（能美、小田ら）、活性酸素検出系kat-sod遺伝子の導入（同志社 西岡、京大 米井）、カキザル肝のトクロールP450を発現するDNAのCHL細胞への導入（北大 鎌滝ら）、また将来はヒト肝P450の導入も検討されている。

第二点は、これらの開発が進むであろうDNA損傷と修復を特定する現象に即した試験法より得た情報を評価し、規制を作り上げるためのcriteriaを提供するリスクアセスメントの確立であろう。遺伝毒性のリスクアセスメントを実施するには、まず適合するデータが、ヒトの遺伝毒性のどの現象を表現しているかを理解することに加え、適当なモデルの適合性が必要とされる。いずれにしても、水環境の遺伝毒性研究の展開と、その評価、制御については研究の端についた感も否めず、今後の展開を期待する上では基礎データの集積が必要であると考ええる。

謝辞

本研究は著者が奉職している京都大学工学部衛生工学教室 水質工学研究室において1987年度より展開してきた研究をまとめたものであります。

京都大学教授 宗宮 功博士には、著者が学生で講座配属の時から御指導を賜っており、この度の研究が今日のように芽をふきだし、さらに安全性の視角から高質な水を創造する研究のおもしろさを知り得たのは、宗宮教授の終始一貫した精力的かつ興味深い御指導の賜と深く感謝しております。

また本論文をまとめるにあたり、京都大学教授 住友 恒博士ならびに同教授 松井三郎博士に、御指導賜りましたことに深甚の謝意を表します。

京都大学助教授 津野 洋博士には、著者の所属する研究室のゼミナールでしばしば本研究に関する有意義なご討議をいただきました。深く感謝致します。

大阪府立公衆衛生研究所 小田美光博士、中村清一博士は、本研究の端緒となりましたumu菌株の提供と、試験法全般に亘る詳細な議論を重ねていただき、著者の変異原研究への水先案内をしていただきました。研究の一段落を報告するとともに深い謝意をお届け致します。

本研究の遂行にあたっては、ゼミナールや修士論文を通して様々にご協力をいただきました。第2章第2節、第3章第2節、第5章第2節は、京都大学技官の河村正純氏と暗中模索の中からumuテストの適用の展開を画策してきました。また第3章第3節は上西琴子嬢（当時修士院生）、第2章第3節、第4章第2節、第5章第3節は川口達也氏（当時修士院生）との精力的なデータ収集でつくりあげられたものです。各氏には深く感謝致します。

そのほか、京都大学助手 山田春美博士には分析上の便宜をいただき、論文をまとめる過程においては忙しい中、同じ研究室の学生、院生諸氏に数値計算、図表清書にご援助いただきました。山田登志夫君、山田正人君、西村文武君、楠田浩雅君、壬生勝泰君、吉川慎一君、ありがとうございました。

